

EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'ATRAZINE A DOSES
SUBLETALES SUR LEMNA MINOR. INFLUENCE DES CATIONS
SUR L'EMISSION DE LA FLUORESCENCE ET CARACTERISTIQUES
DU TRANSPORT PHOTOSYNTHETIQUE DES ELECTRONS

par

PIERROT PÉPIN

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTE DES SCIENCES
UNIVERSITE DE SHERBROOKE

© Sherbrooke, Québec, février 1987

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-38862-5

SOMMAIRE

Les travaux récents sur l'effet des doses sublétales d'atrazine lors de la croissance de la *Lemna minor* font état de transformations majeures de l'ultrastructure des membranes thylakoïdiennes, ainsi que d'importants changements dans les principaux constituants membranaires. L'objectif de notre étude est de déterminer l'influence du traitement sur quelques-unes des caractéristiques photosynthétiques des chloroplastes de *L. minor*, notamment l'émission de la fluorescence chlorophyllienne et le transport photosynthétique des électrons. Nous désirons établir certaines relations entre les changements mentionnés plus haut et les propriétés photosynthétiques des chloroplastes. Voici donc les principaux résultats obtenus et les principales conclusions:

Nos travaux sur la fluorescence montrent que les chloroplastes éclatés de plantes traitées émettent jusqu'à 50% plus de fluorescence que les chloroplastes de plantes témoins. La présence de cations dans le milieu de suspension ne permet pas aux chloroplastes des plantes témoins d'atteindre le niveau d'intensité de la fluorescence émise par ceux des plantes traitées. Toutefois, chez les plantes traitées, l'amplitude de la stimulation de la fluorescence par les cations est considérablement réduite. On ne peut expliquer l'augmentation de la fluorescence par un changement dans la teneur en cations des chloroplastes. De plus, on ne peut rendre compte du phénomène qu'en vertu de modifications d'ordre structural au niveau des membranes. En fait, il s'avère que des changements dans la proportion de chaque photosystème

ou dans la composition pigmentaire et lipidique associée aux sous-unités photosynthétiques sont de nature à influencer la fluorescence. Les observations antérieures sur les constituants membranaires viennent appuyer cette interprétation. Par ailleurs, nos travaux sur l'activité photosynthétique du PS II étudiée par spectrophotométrie en continu et sur l'activité du PS I étudiée par polarographie coïncident avec ces résultats. Chez les plantes traitées, le rendement photosynthétique sous éclairage limitant est supérieur à celui des plantes témoins, tandis que le rendement du PS I, dans les mêmes conditions, est inférieur. À saturation lumineuse, l'activité photosynthétique de chaque photosystème est supérieure à celle des plantes témoins. Ces résultats suggèrent soit une augmentation de la taille du PS II et une diminution de celle du PS I, soit une redistribution de l'énergie en faveur du photosystème II. Finalement, les chloroplastes de plantes traitées montrent une augmentation de près du double de la valeur d'inhibition à 50% de l'activité du photosystème II par l'atrazine *in vitro*. Toutefois, cette différence est atténuée sur le plan statistique par la variation de l'intervalle de confiance. Puisque le rapport chlorophylle a/b ne varie pas à la suite du traitement, ce résultat suggère plutôt un changement dans l'accessibilité de l'atrazine vers son site de fixation plutôt qu'un changement dans la proportion de chaque photosystème.

Nos travaux indiquent des changements importants dans l'activité photosynthétique des chloroplastes de *L. minor* traitées par 0,25 ppm d'atrazine. Cette augmentation coïncide avec les changements observés au niveau de l'ultrastructure et dans la composition membranaire des chloroplastes de plantes traitées. Toutefois, un effort de recherche devrait

être entrepris pour élaborer des méthodes de mesure directe de la taille et de la proportion de chaque photosystème, ainsi que de la fluorescence émise par les diverses sous-unités photosynthétiques dans le but de distinguer parmi ces changements possibles et non mutuellement exclusifs lequel peut être davantage responsable des écarts observés dans nos principaux résultats, cités auparavant, entre les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées à doses sublétales d'atrazine.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent spécialement au professeur Gaston Beaumont pour l'intérêt à la recherche qu'il a su me communiquer, pour son encouragement soutenu au cours de la conception, de la réalisation du projet de recherche et de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier mes conseillers, les docteurs Gilles Grenier et Adrien Beaudoin pour leurs judicieux conseils. Je suis redevable également au docteur France Bessette et au docteur Wolf Seufert du Laboratoire de biophysique au Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke pour leur disponibilité et l'aide technique qu'ils m'ont procurées.

De même, je remercie le docteur W. G. Hopkins et Monsieur André Laroche du Département de biologie végétale de l'Université Western Ontario de London pour leur aide dans l'application des techniques de mesure du transport photosynthétique des électrons. Je remercie également Madame Luce Proteau pour son apport technique et le docteur Jacques Allard du Département de mathématiques pour l'aide apportée lors des analyses statistiques.

Je souligne que la réalisation de ce projet a en outre été rendue possible grâce à la bourse de recherche du Fonds FCAR du Québec.

Enfin, je tiens à témoigner ma très grande reconnaissance à tous les membres de ma famille pour leur appui moral tout au long de ce projet.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES FIGURES EN ANNEXE	xii
LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE	xviii
LISTE DES ANNEXES	xix
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 - METHODOLOGIE	12
2.1 Croissance des plantes	12
2.2 Extraction des chloroplastes	12
2.3 Dosage de la chlorophylle et spectres d'absorption	13
2.4 Emission de la fluorescence à 680 nm	14
2.5 Mesure de l'activité photosynthétique du PS II	15
2.6 Activité photosynthétique du PS I et de la chaîne entière de transport des électrons	16
CHAPITRE 3- RESULTATS	18
3.1 Influence de l'atrazine et du $MgCl_2$ sur les spectres d'absorption et les spectres de fluorescence	18
3.2 Fluorescence et concentration de chlorophylle	21

3.3 Influence de l'atrazine <i>in vivo</i> sur l'émission de la fluorescence	24
3.4 Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ et de KCl sur l'émission de la fluorescence	24
3.5 Effets du pH et du $MgCl_2$ sur l'émission de la fluorescence	28
3.6 Influence de l'atrazine sur l'activité photosynthétique du photosystème II	30
3.7 Influence de l'atrazine sur l'activité photosynthétique du PS I	32
3.8 Influence de l'atrazine sur l'activité photosynthétique de la chaîne entière de transport des électrons	34
3.9 Détermination de l'inhibition à "50%" (I_{50}) de l'activité photosynthétique du PS II par l'atrazine <i>in vitro</i> ...	37
CHAPITRE 4 - DISCUSSION	39
CHAPITRE 5 - CONCLUSION	63
ANNEXES	65
BIBLIOGRAPHIE	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

16:1 _t	: acide trans- Δ_3 -hexadécénoïque
Atrazine	: 2- chloro- 4 (éthylamino) -6- (isopropylamino) -s- triazine
chl	: chlorophylle
DCMU	: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DCPIP	: 2,6 dichlorophénolindophénol
DDG	: diacyldigalactosylglycérol
DGG	: diacylgalactosylglycérol
DTE	: dithioérhythriol
EDTA	: éthylènediamine tétraacétate
LHC II	: complexe collecteur de lumière pour le photosystème II ou antenne collectrice de lumière.
MV	: méthyl-viologène
PG	: phosphatidylglycérol
PS I	: photosystème I
PS II	: photosystème II
TMPD	: N, N, N', N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Spectre d'absorption d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine en présence ou en l'absence de 1 mM de $MgCl_2$	19
Figure 2: Spectre d'excitation de fluorescence et de lumière diffusée d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	20
Figure 3: Spectre d'émission de fluorescence et de lumière diffusée d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine et excitée à deux longueurs d'onde différentes (A) en présence ou en l'absence de 1 mM de $MgCl_2$ (B)	22
Figure 4: Intensité relative de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine pour différentes quantités de chlorophylle totale (a+b) en présence ou en l'absence de 1 mM de $MgCl_2$	23
Figure 5: Effet de l'atrazine <i>in vivo</i> sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	23
Figure 6: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	25

Figure 7:	Influence de concentrations variées de KCl sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	27
Figure 8:	Influence du pH sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine en l'absence (A) et en présence de 1 mM de $MgCl_2$ (B)	29
Figure 9:	Courbe de saturation lumineuse pour la réduction du DCPIP à 590 nm d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B) (activité du PS II)	31
Figure 10:	Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B) (activité du PS I)	33
Figure 11:	Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B) (activité de la chaîne entière de transport des électrons)	35
Figure 12:	Effet du pH sur la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine lors de la mesure de l'activité photosynthétique de la chaîne entière en l'absence de $MgCl_2$ (A) et en présence de 1 mM de $MgCl_2$ (B)	36

Figure 13: Effet de concentrations variées d'atrazine sur le taux de photoréduction du DCPIP par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et résultats exprimés selon le pourcentage de l'activité de départ (B)	38
--	----

LISTE DES FIGURES EN ANNEXE

Figure A 1.1:	Influence de la concentration de chlorure de magnésium sur l'émission de la fluorescence par les chloroplastes de l'épinard	67
Figure A 2.1:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	69
Figure A 2.2:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine.....	69
Figure A 2.3:	Influence de différentes concentrations de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	69
Figure A 2.4:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	70
Figure A 2.5:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine extraits en l'absence de NaCl	70

Figure A 2.6:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine extraits en l'absence ou en présence de 5 mM de NaCl	70
Figure A 2.7:	Influence de concentrations variées de KCL sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine et effet de l'utilisation de EDTA lors de l'extraction	72
Figure A 2.8:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins conservés en présence ou en l'absence de 0,1 M de sorbitol	72
Figure A 2.9:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> traitées par 0,25 ppm d'atrazine conservés en présence ou en l'absence de 0,1 M de sorbitol	72
Figure A 3.1:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	75

Figure A 3.2:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine conservés en présence de 0,1 M de sucrose	75
Figure A 3.3:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins homogénéisés dans le tampon tris-HCl à 50 mM à pH 7,5 ou Na-tricine à pH 7,4 et conservés dans le tampon Na-tricine à 25 mM à pH 7,5 en présence de 0,1 M de sucrose	75
Figure A 5.1:	Influence de concentrations variées de Na-tricine sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	81
Figure A 6.1:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine et excités aux longueurs d'onde de 440 et 470 nm à pH 7 (A) et à pH 8 (b)	83
Figure A 6.2:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (pH 8)	84

Figure A 7.1:	Illustration du montage expérimental pour les essais sur le transport photosynthétique des électrons au niveau du PS II (A) et modifications apportées au support à cuvette du spectrophotomètre (B)	86
Figure A 8.1:	Illustration du montage expérimental pour les essais sur le transport photosynthétique des électrons pour le PS I et la chaîne entière	88
Figure A 8.2:	Plan du circuit électrique de l'oxymètre (YSI-4004) et du circuit accessoire	89
Figure A 8.3:	Influence de concentrations variées de chlorophylle sur la consommation d'oxygène par des chloroplastes de <i>L. minor</i> lors de la mesure du transport des électrons au niveau du PS I	91
Figure A 9.1:	Courbe de saturation lumineuse pour la réduction du DCPIP d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)	92
Figure A 9.2:	Courbe de saturation lumineuse pour la réduction du DCPIP d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)	93
Figure A 10.1:	Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)	94

Figure A 11.1: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)	95
Figure A 11.2: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)	96
Figure A 11.3: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)	97
Figure A 11.4: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)	98
Figure A 12.1: Effet de la durée de conservation sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine en présence de 1 mM de $MgCl_2$ et conservée à 5 ° C (A) ou à 23 ° C (B)	100
Figure A 12.2: Effet de la durée de conservation sur l'activité photosynthétique du PS I par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	101

Figure A 12.3: Effet de la durée de conservation sur l'activité photosynthétique du PS I par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	101
Figure A 12.4: Effet de la durée de conservation sur l'activité photosynthétique de la chaîne entière de transport des électrons par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	101
Figure A 13.1 Augmentation de la fluorescence d'une suspension de de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine en présence de 1 mM de $MgCl_2$	104

LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE

- Tableau A 3.1: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$
sur l'émission de la fluorescence d'une suspension
de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par
0,25 ppm d'atrazine et extraits dans le tampon Tris-HCl
à 50 mM et à pH 7,5 (avec ou sans coussin de Percoll) ou dans
le tampon Na-tricine à 50 mM et à pH 7,5 77
- Tableau A 4.1: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'émission
de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes
de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine
et effet de l'osmolarité du milieu de conservation des
chloroplastes et du milieu d'essai de la fluorescence..... 79
- Tableau A 8.1: Variation du taux de consommation d'oxygène par une
suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins
selon deux voltages de l'enregistreur 91

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1: Influence de la concentration de magnésium (MgCl_2) sur l'émission de la fluorescence à 680 nm par les chloroplastes de l'épinard 66
- Annexe 2: Influence de la concentration de chlorure de magnésium (MgCl_2) et de chlorure de potassium (KCL) sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine et isolés sur coussin de Percoll en présence ou en l'absence de sorbitol, NaCl et EDTA 68
- Annexe 3: Influence de concentrations variées de MgCl_2 sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées. Effet du tampon Tris-HCl, du tampon Na-tricine et du coussin de Percoll, ainsi que du sucrose 74
- Annexe 4: Influence de concentrations variées de chlorure de magnésium (MgCl_2) sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine; influence de l'osmolarité du milieu de conservation des chloroplastes et du milieu d'essai lors des lectures de la fluorescence 78

Annexe 5:	Influence de concentrations variées de Na-tricine à pH 8 sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine	80
Annexe 6:	Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ et du pH sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine excités à 440 et à 470 nm	82
Annexe 7:	Mesure par spectrophotométrie en continu du transport photosynthétique des électrons au niveau du PS II; montage expérimental	85
Annexe 8:	Mesure par polarographie du transport photosynthétique des électrons au niveau du PS I et de la chaîne entière; montage expérimental et plan du circuit électrique de l'oxymètre "YSI-4004"	87
Annexe 9:	Influence de l'atrazine et de l'intensité lumineuse sur l'activité du PS II	92
Annexe 10:	Influence de l'atrazine et de l'intensité lumineuse sur l'activité du PS I	94
Annexe 11:	Influence de l'atrazine et de l'intensité lumineuse sur l'activité photosynthétique de la chaîne entière de transport des électrons	95
Annexe 12:	Durée de conservation des chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine <i>in vitro</i> ; influence sur l'émission de la fluorescence à 680 nm	

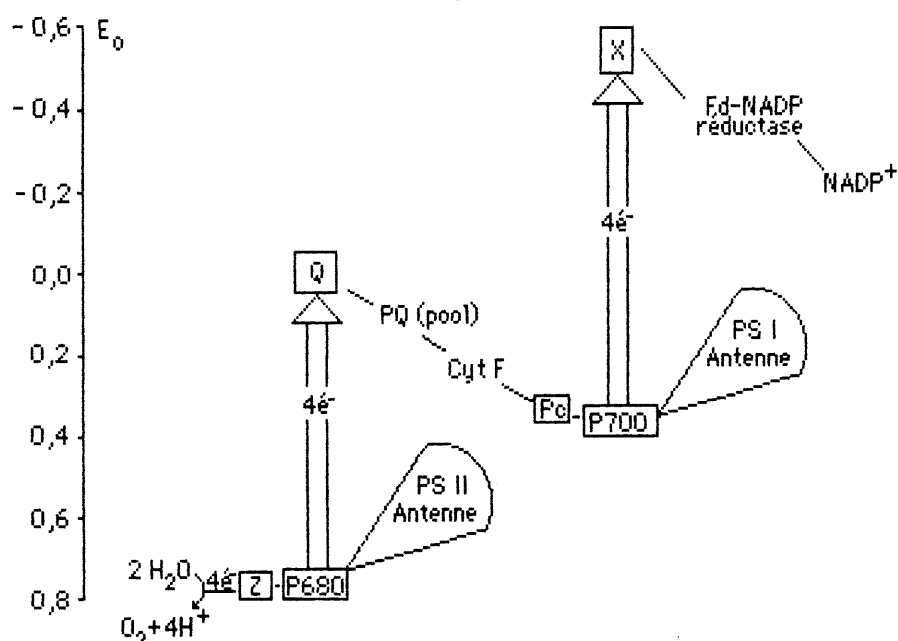
en présence de MgCl_2 et sur l'activité photosynthétique
du PS I et de la chaîne entière du transport des électrons 99

Annexe 13:	Temps minimum nécessaire à une émission maximale de l'intensité de la fluorescence en présence de 1 mM de MgCl_2 par une suspension de chloroplastes de <i>L. minor</i> témoins et traitées à l'atrazine 103
------------	--

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La photosynthèse est le processus par lequel les chloroplastes des plantes vertes convertissent l'énergie solaire en énergie chimique. C'est au niveau de la membrane thylakoïdienne du chloroplaste que s'accomplissent les étapes primaires de la photosynthèse conduisant à la synthèse de NADPH et d'ATP. Le transfert des électrons des molécules d'eau au NADP^+ nécessite le fonctionnement en série du photosystème II (PS II) et du photosystème I (PS I). Le transport des électrons requiert une série de réactions d'oxydoréduction et produit une synthèse nette d'ATP. Chaque photosystème possède son propre système pigmentaire collecteur de lumière (antenne) permettant un transfert efficace de chaque photon absorbé vers son centre réactionnel (schéma 1) (RABINOWICH, 1969; DUFRESNE, 1978; ALLEN, 1983). Les antennes collectrices de lumière (LHC II) du PS II sont formées des sous-unités LHCP¹, LHCP² et LHCP³ en contact étroit avec le centre réactionnel, le CPa. Le CP1a et CP1 constituent le centre réactionnel du PS I (THORNBURGH, 1975; ANDERSON & al., 1978; ANDERSON, 1980; WOLLMAN & al., 1980 a). Les antennes collectrices (LHC I) du PS I peuvent être dissociées des centres réactionnels par traitement au détergent (HAWORTH & al., 1983; ANDERSON, 1984; LAM & al., 1984a, 1984b; DUNAHAY & STAEHELIN, 1985). Les centres réactionnels contiennent des molécules de chlorophylle a, tandis que les antennes contiennent des molécules de chlorophylle a et b.



Schema 1: Illustration de la chaîne de transport photosynthétique des électrons selon le modèle de Hill-Bendall (1960). L'absorption d'un quantum lumineux par les antennes collectrices conduit au transfert de son énergie à un photorécepteur chromatophore, soit le P680 et le P700, pigments-pièges respectivement pour le PSII et le PSI. Le P680 excité produit un réducteur faible Q^- et un oxydant fort Z^+ capable d'arracher les électrons aux molécules d'eau. Le P700 excité produit un oxydant faible Pc^+ et un réducteur fort X^- capable de réduire le $NADP^+$. Les principaux éléments de la chaîne de transport sont représentés sur le schéma: l'élément Z (complexe protéiné responsable de la photolyse de l'eau), l'accepteur primaire d'électrons pour le PSII (Q), plastoquinone (PQ), cytochrome F (Cyt F), plastocyanine (Pc), l'accepteur primaire pour le PSI (X) et la ferrédoxine-NADP⁺ réductase.

La fluorescence est un processus de dissipation de l'énergie des chlorophylles à l'état excité (PAPAGEORGIOU, 1975). À la température ambiante (24 °C), la fluorescence chlorophyllienne provient des molécules de chlorophylle a-678 nm des LHC du PS II (MILLS, 1976; BOSE, 1982). Le rendement de la fluorescence (nombre de quanta émis/nombre de quanta absorbés) dépend des autres processus de dissipation de l'énergie des

molécules de chlorophylle a en état d'excitation. L'induction, par la lumière, du transport des électrons au niveau du centre réactionnel du PS II est de loin le processus le plus important relié à la réduction de l'accepteur primaire " Q_A " et du pool des accepteurs secondaires d'électrons " Q_B " (LAVOREL & JOLIOT, 1972; GOVINDJEE & al., 1973; PAPAGEORGIOU, 1975; MALKIN, 1981; KYLE, 1985). DUYSSENS & SWEER (1963) furent les premiers à suggérer que la fluorescence émise par le PS II était régie par l'accumulation à l'état réduit d'une molécule "Q", quencher de la fluorescence à l'état oxydé. La photoréduction de l'accepteur primaire d'électrons via le pigment-piège "P680" est la principale voie de dissipation de l'énergie des chlorophylles excités *in vivo*. Lorsque le P680 est sous sa forme oxydée $P680^+$ après l'absorption d'un quantum ou l'accepteur primaire sous sa forme réduite Q_A^- , le centre de réaction ne peut plus accepter des nouvelles excitations des antennes à cause de son état d'oxydoréduction (trappes fermées) et la fluorescence est maximum. L'accumulation des Q_A^- est favorisée par l'illumination des chloroplastes à de grandes intensités lumineuses, ainsi que par la présence d'herbicides comme l'atrazine ou le DCMU qui, en bloquant le transport des électrons, empêchent la réoxydation de l'accepteur primaire d'électrons (BOWES & al., 1981). *In vivo*, la fluorescence chlorophyllienne n'est que de 2 à 3 unités, tandis qu'*in vitro*, elle dépasse les 20 unités en l'absence de transport d'électrons (RABINOWITCH, 1958).

On définit la fluorescence constante (F_0) comme la libération d'énergie d'excitation absorbée par le PS II avant même d'atteindre le pigment-piège "P680" (MALKIN & KOK, 1966; MALKIN & al., 1981; BUTLER, 1978). Cette

fluorescence, émise par les molécules de chlorophylle associées aux LHC II des membranes, est causée soit par leur développement incomplet soit par une mauvaise liaison des LHC II aux centres réactionnels. L'absorption de cette énergie d'excitation non disponible pour le processus photochimique est donc immédiatement émise sous forme de fluorescence (KYLE & ZALIK, 1982). L'énergie d'excitation peut aussi être dissipée sous forme de chaleur par suite d'un désordre structural ou d'une mauvaise orientation des pigments (PAPAGEORGIOU, 1975). La perte d'énergie sous forme de chaleur est alors difficilement évaluable.

D'autres études ont permis d'observer que la fluorescence est aussi influencée par la présence de cations. Ainsi, ISAWA & GOOD (1966) ont observé que les cations *in vitro* contrôlaient la formation de grana. HOMANN (1969), de son côté, a constaté qu'en présence de cations, les chloroplastes de classe 2 (chloroplastes éclatés) émettaient davantage de fluorescence. MURATA (1969) fut le premier à suggérer que le magnésium supprimait le spillover, soit le transfert d'énergie des chlorophylles a_{II} du PS II vers les chlorophylles a_I du PS I. Le terme spillover ne s'applique que dans le cas d'un surplus d'énergie d'excitation absorbée par le PS II. C'est pourquoi de nos jours, on préfère utiliser le terme de redistribution de l'énergie lumineuse, qui est plus général et qui peut s'appliquer à d'autres situations (schéma 2). BUTLER & KITAJIMA (1975), proposèrent successivement le modèle bipartite et le modèle tripartite (BUTLER, 1978) pour tenter de qualifier les différents types de transferts d'excitons possibles entre les photosystèmes et les LHC au regard des modifications causées par la présence de cations dans le milieu de suspension

des chloroplastes. Selon ce modèle, l'effet majeur des cations est d'augmenter le taux de couplage d'énergie entre les LHC II et les Chl a_{11} du PS II, ainsi que la libération d'énergie sous forme de chaleur. Simultanément, il provoquerait une diminution du taux de transfert d'énergie entre les Chl a_{11} du PS II vers les Chl a_1 du PS I (spillover) et des transferts d'énergie des LHC II vers PSI (transfert alpha; BUTLER, 1978). Les cations causeraient moins de variations dans le transfert alpha que dans le spillover (BUTLER & KITAJIMA, 1975; WONG & al., 1981). Toutefois, en utilisant un mutant du maïs (hcf^*-3), LETO & ARNTZEN (1981) montrèrent que le transfert alpha contribue de façon importante au contrôle de la distribution de l'énergie par les cations.

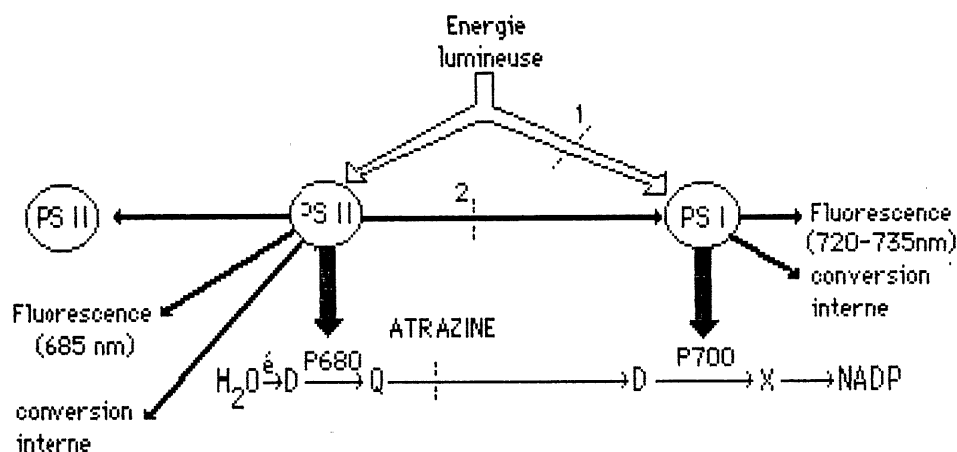


Schéma 2: Illustration des principales voies de distribution et de dissipation de l'énergie lumineuse; sites d'inhibition des transferts d'excitons par l'empilement granaire ou par la sensibilisation directe (1), sites d'inhibition par l'empilement granaire (2). L'induction de l'empilement granaire par les cations supprimerait un transfert d'excitons du PS II au PS I et augmenterait le transfert d'excitons entre les unités du PS II. Le blocage d'une ou de plusieurs voies entraînerait une augmentation des excitons dissipés par les

autres voies, dont la fluorescence. BRIANTAIS (1982) a suggéré que les changements pourraient être attribuables à des variations plus discrètes, comme l'orientation, au niveau des LHC par la sensibilisation directe. Les Donneurs d'électrons Z (élément Z) et Pc (plastocyanine) sont représentés par le symbole "D" sur le schéma.

Plusieurs facteurs favorisent l'empilement des membranes thylakoïdiennes. Les facteurs du milieu d'isolement des chloroplastes, de même que l'élévation du contenu en cations du milieu de suspension des chloroplastes éclatés, provoquent l'empilement granaire. L'abaissement du pH de la suspension entre 4 et 5 amène un empilement maximum. L'empilement granaire est indépendant de la teneur en anions de la suspension, ainsi que de la force osmotique du milieu (BARBER, 1980). L'explication la plus probable du processus d'empilement induit par les cations est que deux forces régissent l'accolement thylakoïdien: des forces d'attraction hydrophobe et des forces de répulsion électrostatique (BARBER 1977, 1980, 1982; BARBER & CHOW, 1979). L'ajout de cations diminuerait les forces de répulsion électrostatique des membranes par l'annulation des charges de certains complexes chargés négativement, ce qui permettrait alors aux forces hydrophobes de favoriser l'empilement. Pour ce faire, il est nécessaire que soit exercé un mouvement latéral sur la surface de la membrane des complexes protéiques chargés négativement. Ce mouvement a plusieurs conséquences. Il distingue la composition membranaire dans les régions d'accolement thylakoïdien exposées ou non au stroma (membranes périphériques des grana et thylakoïdes inter-granaires). Egalement, le facteur de couplage, la ferrédoxine-NADP⁺ réductase et la majorité des PS I se retrouveraient surtout dans les régions

exposées au stroma; les LHC II et les centres réactionnels des PS II, surtout dans les régions d'accolement thylakoïdien (BRIANTAIS, 1982). Puisque la proximité spatiale est nécessaire au transfert d'excitons, la séparation des photosystèmes I et II conduit à l'élévation de la fluorescence.

Par ailleurs, la région exposée des complexes protéines-chlorophylles associés au LHCP contribuerait à l'empilement granaire en compensant la charge négative à la surface ou en stabilisant les interactions directes au niveau de la membrane (BURKE & al., 1978; RYRIE & al., 1980; MULLET & ARNTZEN, 1980). La digestion douce des membranes par la trypsine rend les cations inefficaces à produire des changements dans l'émission de la fluorescence et dans l'empilement granaire (JENNINGS & al., 1978, 1981). L'enzyme protéolytique dégraderait préférentiellement aux moins deux des quatre polypeptides principaux des LHC et libérerait un segment terminal exposé au stroma d'environ 2 Kd chargé positivement et libre de chlorophylle (STEINBAK & al., 1979). Ce segment associé à l'empilement ne contiendrait pas de sites cationiques (RYRIE & FUAD, 1982) et serait responsable des forces ou interactions membranaires de faible portée indispensables à l'accolement thylakoïdien (STEINBACK & al., 1979; MULET & ARTNZEN, 1980). Les travaux de DAVID & GROSS, (1975); PROCHASKA & GROSS, (1977) confirment que les LHCP possèdent des sites leur permettant de fixer les cations.

Les lipides des membranes photosynthétiques auraient aussi un rôle important à jouer dans l'architecture et l'activité photosynthétique des photosystèmes I & II (QUINN & WILLIAMS, 1983; ANDERSON, 1981, 1982). La possibilité que des charges négatives associées aux groupements phosphates

des phospholipides puissent intervenir dans le processus est très faible (NAKATANI & al., 1978). Plusieurs études montrent une corrélation positive entre la synthèse de l'acide trans- Δ_3 -hexadécénoïque du PG et la formation de grana (TREMOLIERE & al., 1981; GUILLOT-SALOMON al., 1980; DUVAL & al., 1980). Les travaux récents de BROWSE & McCOURT (1985) indiquent l'absence totale de relation entre la synthèse d'acide trans- Δ_3 -hexadécénoïque, la structure et fonction des membranes thylakoïdiennes des chloroplastes. Tout au plus, la présence du trans- $C_{16:1}$ -PG pourrait aider à stabiliser les formes oligomériques des LHCP (McCOURT & al., 1985). De plus, il y aurait absence de corrélation entre le contenu en galactolipides sur une base de chlorophylle et l'empilement granalre. (BISHOP & al., 1971). Par contre, les galactolipes auraient un rôle important à jouer dans le transport des électrons et l'architecture des photosystèmes (NISHO & al., 1985; MURPHY, 1982)

Le transport photosynthétique des électrons peut être mesuré chez les deux photosystèmes ou pour chaque photosystème individuellement grâce à l'utilisation sélective de donneurs et receveurs d'électrons, naturels ou artificiels. Selon les caractéristiques physico-chimiques du receveur ou du donneur à l'état réduit ou oxydé, l'activité photosynthétique peut être déterminée par la mesure du taux d'oxydation ou de réduction (schéma 3). Les courbes de saturation par la lumière de l'activité photosynthétique des photosystèmes peuvent être subdivisées en deux régions principales (MAUZERALL & HERRON, 1970). Les régions linéaires, aux faibles intensités lumineuses reflètent l'efficacité des photosystèmes à capter et à transférer l'énergie d'excitation vers les centres réactionnels jusqu'au pigment-piège

(HERRON & MAUZERALL, 1972). À saturation par la lumière, l'activité photosynthétique est limitée par les réactions d'oxydoréduction et c'est la réaction la plus lente de la chaîne qui détermine le temps de renouvellement du système (GHIRANDI & MELIS, 1984). La réduction du pool de plastoquinone et la diffusion des PQ réduites vers le photosystème I sont reliées à l'étape limitante du transport de l'électron *in vivo* (ANDERSON, 1982).

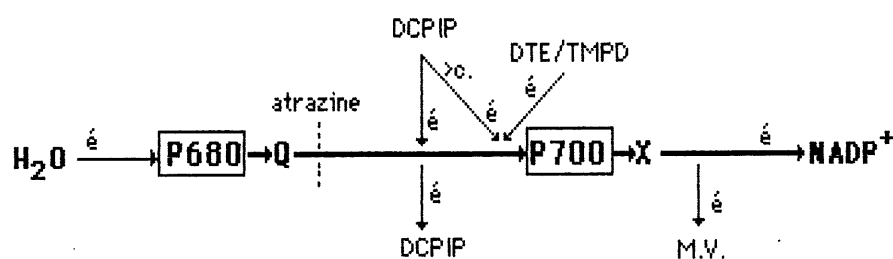


Schéma 3: Illustration de quelques réactions de photoréduction catalysées par le chloroplaste. L'activité du PS II est mesurée par la réduction du DCPIP à 590 nm selon la réaction $\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{PSII}} \text{DCPIP}$. Le site de réduction du DCPIP est situé entre le PS II et le PS I, près du cytochrome f. L'activité du PS I peut être mesurée par l'emploi du DCPIP réduit selon la réaction "asc/DPIP $\xrightarrow{\text{PSI}}$ MV" le DCPIP réduit possède deux sites de donation: un près du P700 (forte concentration) et l'autre avant le cytochrome f et la plastocyanine (MURATA, 1969; GOULD & IZAWA, 1973). L'activité du PS I peut être aussi déterminée par la réaction "DTE/TMPD $\xrightarrow{\text{PSI}}$ MV". Le TMPD réduit par le DTE, donnerait ses électrons près du P700. Le MV réduit réagit immédiatement avec l'oxygène présent du milieu et le taux oxygène consommé sert de mesure d'activité. Dans ces réactions, on utilise du DCMU pour inhiber le transport des électrons en provenance du PS II (MURATA, 1969; VERNON & SHAW, 1969; SUN & SAUER, 1971).

L'action "herbicide" des s-triazines fut découverte en 1952. L'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-s-triazine) inhibe la réaction de Hill, c. à d. la formation d'oxygène par une suspension de chloroplastes en présence de lumière et d'un receveur d'électrons (méthyl-viologène, ferricyanure). L'atrazine bloque le transport des électrons entre l'accepteur primaire d'électron et le pool de plastoquinone (PQ) en se liant au deuxième

accepteur stable d'électrons pour le PS II, une protéine de 32 Kd (STEINBACK & al., 1981). Selon l'hypothèse la plus répandue, la protéine de 32 Kd ou protéine Q_B agirait comme une "Q/PQ oxydoréductase" pour le PS II (MARDER & al., 1984). La synthèse et la dégradation de ce polypeptide sont contrôlées par l'exposition des plastes à la lumière. Parmi les protéines du chloroplaste, la protéine Q_B possède le taux de renouvellement le plus élevé, jusqu'à cinquante fois supérieur à celui des protéines des LHCP. La dégradation de la protéine serait provoquée par les dommages qui lui sont infligés lors de sa participation aux transferts des électrons et elle est ralentie en présence d'atrazine et chez les plantes résistantes à cet herbicide (MATTOO & al., 1984a; KYLE & al., 1984; ARTZEN & al., 1984; BENNET, 1984; KYLE, 1985).

L'atrazine administrée à doses sublétales lors de la croissance de la *Lemna minor* favorise la formation de membranes granaires tout en réduisant celles des membranes thylakoïdiennes (BEAUMONT & al., 1980). De plus, le traitement à l'atrazine provoque d'importants changements dans la composition des principaux constituants membranaires, notamment dans la composition lipidique des membranes et dans la nature biochimique des LHCP (BEAUMONT & al., 1976 a, 1976 b, 1980 ; GRENIER, 1979, 1982, 1987; LAROCHE, 1983).

Ce projet de recherche a pour but de caractériser les propriétés photosynthétiques des chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées à l'atrazine. Dans le cadre de cette étude, nous analyserons l'effet du traitement à l'atrazine sur l'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 680 nm des chloroplastes de *L. minor* dans des conditions d'expérimentation

différentes: influences des cations (magnésium, potassium) et du pH. Nous mesurerons l'activité photosynthétique pour les PS II et PS I et la chaîne entière de transport des électrons. Cette étude permettra d'établir une relation entre les changements observés au niveau de l'ultrastructure, de la composition membranaire des thylakoïdes et des propriétés photosynthétiques des chloroplastes.

CHAPITRE 2

METHODOLOGIE

2.1 Croissance des plantes

Des frondes de *Lemna minor* (environ 25) sont placées aseptiquement dans des erlenmeyers de 1000 ml contenant 200 ml de solution Hoagland modifiée (témoins), en présence de 0,25 ppm d'atrazine (traitées). La croissance des plantes se poursuit pendant 15 jours dans une chambre de croissance à atmosphère contrôlée sous une intensité lumineuse de 13800 lux et une héméropériode de 16 heures. La température diurne est de 23 °C et la température nocturne est de 18 °C (BEAUMONT & al., 1976 a).

2.2 Extraction des chloroplastes

Les chloroplastes sont extraits à partir de 16 g de tissus frais de *Lemna minor*. Les plantes sont préalablement rincées à l'eau du robinet et à l'eau distillée, puis éponnées sur papier absorbant. Les tissus partagés en deux quantités de 8 g sont homogénéisés au broyeur à hélice (waring blender) d'une capacité de 50 ml à vitesse moyenne pendant trois périodes de 2 secondes chacune en présence de 40 ml de tampon tris-HCl à 50 mM à pH 7,5 et à 4 °C contenant 0,3 M de sucrose pour les plantes témoins et de 0,7 M de sucrose pour les plantes traitées à l'atrazine.

L'homogénat est filtré sur 4 épaisseurs de coton fromage et une épaisseur de miracloth préalablement imbibé avec le tampon d'homogénéisation. Le filtrat obtenu (80 à 90 ml) est distribué dans deux tubes de 50 ml à fond rond, puis centrifugé pendant 3 min. à 5000 x g (rotor Beckmam JA-20) à 4 ° C. Chaque culot est immédiatement (10 à 15 sec.) et délicatement suspendu à l'aide d'un pinceau dans 1,5 ml du tampon d'homogénéisation sans sucrose, puis complété à 20 ml avec du tris-HCl à 50 mM à pH 7,5 contenant 0,1 M de sucrose. Les suspensions sont combinées, puis centrifugées pendant 3 min. à 5000 x g et 4 ° C. Les culots constitués de chloroplastes éclatés sont repris dans 1,7 ml de tampon Na-tricine à 25 mM à pH 6,5 et à 5 ° C contenant 0,1 M de sucrose pour les chloroplastes de plantes témoins et dans 0,7 ml pour les culots de chloroplastes de plantes traitées. Tous les extraits sont conservés sur la glace fondante dans l'obscurité dès le début de l'homogénéisation.

2.3 Dosage de la chlorophylle et spectres d'absorption

La chlorophylle est dosée par colorimétrie (spectronique-20) selon la méthode d'ARNON (1949) en prélevant 25 µl de la suspension de membranes photosynthétiques à laquelle nous ajoutons 5 ml d'un mélange acétone-eau (4:1) et en rapportant les densités optiques (D.O.) dans les équations suivantes:

$$\text{Chl}_{\text{total}} \text{ (mg/ml)} = 0,02020 (\text{D.O.}_{645}) + 0,00802 (\text{D.O.}_{663})$$

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/ml)} = 0,01270 (\text{D.O.}_{645}) + 0,00269 (\text{D.O.}_{663})$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/ml)} = 0,00229 (\text{D.O.}_{645}) + 0,00468 (\text{D.O.}_{663})$$

Les spectres d'absorption des suspensions de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine ont été effectués au moyen d'un spectrophotomètre "Pye Unicam SP 800" dans le tampon Na-tricine à 20 mM et à pH 7,5 en présence ou en l'absence de 1 mM de $MgCl_2$.

2.4 Emission de la fluorescence chlorophyllienne à 680 nm

En présence de cations, la mesure de la fluorescence s'effectue de la manière suivante: une aliquote de 10 μ l de la suspension de chloroplastes contenant 1 mg/ml de chlorophylle est mélangée à 2 ml d'une solution de $MgCl_2$ (0 à 2 mM) ou de KCl (0 à 150 mM) solubilisée dans le tampon Na-tricine à 25 mM, à pH 7,5 et à 22 ° C pour atteindre une concentration finale en chlorophylle de 5 μ g/ml. Après une incubation de 5 min. à la température ambiante, la fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Zeiss DMR-21) muni d'un fluorimètre (Zeiss FM4). Les seuils de sensibilité du tube photomultiplicateur dans l'UV et le spectre visible (185 à 750 nm) sont de 0,3 à 440 nm et de 3 à 1000 nm.

Les longueurs d'onde d'excitation à 440 nm et d'émission à 680 nm sont ajustées aux monochromateurs et sont produites par une lampe au xénon de 450 watts (fentes de type géométrique de 1,5 mm). Toutes les lectures de fluorescence sont effectuées en moins de 150 min. à partir du moment de l'extraction des chloroplastes.

La composition du milieu de suspension variera selon la nature de l'expérimentation. Ces précisions sur la méthodologie seront apportées lors de la présentation des résultats sur l'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 680 nm lors de l'étude de concentrations variées d'atrazine *in vitro* et du pH du milieu de suspension des chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées.

2.5 Mesure de l'activité photosynthétique du PS II

Le transport des électrons au niveau du PS II (réaction de Hill) a été mesuré par spectrophotométrie en continu par la photoréduction de l'accepteur d'électrons, le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP), à 590 nm selon la procédure utilisée par HOPKINS (1980) à l'aide d'un spectrophotomètre "Pye Unicam SP800" adapté à cet effet (voir annexe 7). Lors de cette réaction, l'eau est le donneur d'électrons du PS II.

Un volume de 18 μ l de la suspension de chloroplastes de classe 2 contenant 1,5 μ g /ml de chlorophylle est mélangé à 2,5 ml de tampon phosphate de sodium à 10 mM, à pH 6,4 et à 24 ° C en présence de chlorure d'ammonium à 5 mM servant de découpleur de la réaction. Après une incubation de 5 min., 200 μ l de DCPIP à 0,164 mM solubilisé dans le tampon phosphate de sodium sont ajoutés à l'échantillon. Le tube témoin (absorption 0) est de 2,7 ml du même tampon sans DCPIP. Avec une quantité de chlorophylle de 10 μ g/ml, la densité optique se situe aux environs de 0,5 à 590 nm au point de départ (temps zéro) avant l'illumination des chloroplastes.

La réaction s'amorce lorsqu'on illumine la suspension de chloroplastes sous un angle de 90° avec une lumière actinique filtrée (rouge Corning CS 2-64 "sharp cut 620"). L'intensité lumineuse variant de 0 à $3800 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ est ajustée à l'aide d'un photomètre (Li-cor; Li-185B) muni d'un détecteur modèle Quantum. Le phototube est protégé de la lumière diffusée par un filtre bleu (Corning "cut off 590"). La spécificité de la réaction est évaluée par l'introduction d'un inhibiteur, le DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée). L'éthanol nécessaire pour solubiliser cet herbicide ne dépasse pas 0,05 % (v/v) dans le milieu de réaction.

2.6 Activité photosynthétique du PS I et de la chaîne entière de transport des électrons

Le transport de l'électron au niveau du PS I ou de la chaîne entière est mesuré par polarographie selon la procédure décrite par HOPKINS (1980).

L'activité du PS I ou celle de la chaîne entière est évaluée dans une cellule photosynthétique de 2 ml contenant du tampon phosphate de sodium à 50 mM, du méthyl-viologène à 0,2 mM (accepteur d'électrons), de l'azide de sodium à 1 mM (inhibiteur de la catalase), du chlorure d'ammonium à 5 mM, du DCMU à 2 μM et 10 μg de chlorophylle/ml à 24°C .

La réaction est amorcée par une lumière blanche (EKE, halogène) de 150 watts (Sylvania) transmise par fibre optique jusqu'à la cellule. L'intensité lumineuse variable, de 0 à $3000 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, est ajustée au photomètre. La

consommation d'oxygène dans le milieu de suspension des chloroplastes est évaluée grâce à un oxymètre de type YSI-4004 muni d'une électrode à oxygène de type clark (annexe 8).

Pour la mesure de l'activité du PS I, on ajoute 0,2 ml d'un mélange fraîchement préparé des deux donneurs d'électrons suivants: N, N, N', N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD), dithioerhythritol à 0,5 mM (DTE) et à 1,8 ml du tampon phosphate de sodium à 0,55 mM à pH 8 et à 24 ° C contenant du méthyl-viologène à 0,22 mM, de l'azide de sodium à 1,1 mM et du chlorure d'ammonium à 0,22 mM. Une aliquote d'une suspension de chloroplastes est ajoutée pour obtenir une concentration finale équivalente à 10 µg de chlorophylle par ml. Le milieu de réaction doit être saturé en oxygène. Il est aussi nécessaire d'introduire dans le milieu 5 µl de DCMU à 4 mM solubilisé dans un mélange méthanol-eau 1:1 (v:v) afin de bloquer le transfert des électrons du PS II vers le PS I.

Lors de la mesure du transport des électrons au niveau de la chaîne entière, le TMPD, le DTE et le DCMU sont omis du milieu. L'eau agit comme donneur d'électrons pour le PS II.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Influence de l'atrazine et du $MgCl_2$ sur les spectres d'absorption et les spectres de fluorescence

Le spectre d'absorption des chloroplastes éclatés de *L. minor* traitées à l'atrazine en suspension dans le tampon Na-tricine à 20 mM à pH 7,5 est très semblable à celui des chloroplastes de plantes témoins (figure 1). Ainsi, dans la région du bleu-violet, les spectres présentent un maximum à 440 nm accompagné d'un épaulement dans la région des 470 nm. Dans la région du rouge, les spectres affichent un maximum à 680 nm avec épaulement vers 650 nm. La présence de chlorure de magnésium à 1 mM dans le milieu de suspension ne semble pas modifier la qualité du spectre; les seuils maxima d'absorption et les épaulements se situent dans les mêmes régions du spectre. Cependant, l'ajout de chlorure de magnésium diminue légèrement le degré d'absorption dans la région des 440 nm chez les chloroplastes de plantes témoins (de 0,6 à 0,5) et celui des chloroplastes de plantes traitées (de 0,65 à 0,62). Dans la région des 550 nm, le chlorure de magnésium semble favoriser l'absorption des chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées.

Le spectre d'excitation de la fluorescence évaluée par la lumière émise à 680 nm par les suspensions de chloroplastes des plantes témoins et des plantes traitées affiche un maximum identique à 474 nm (figure 2). Toutefois,

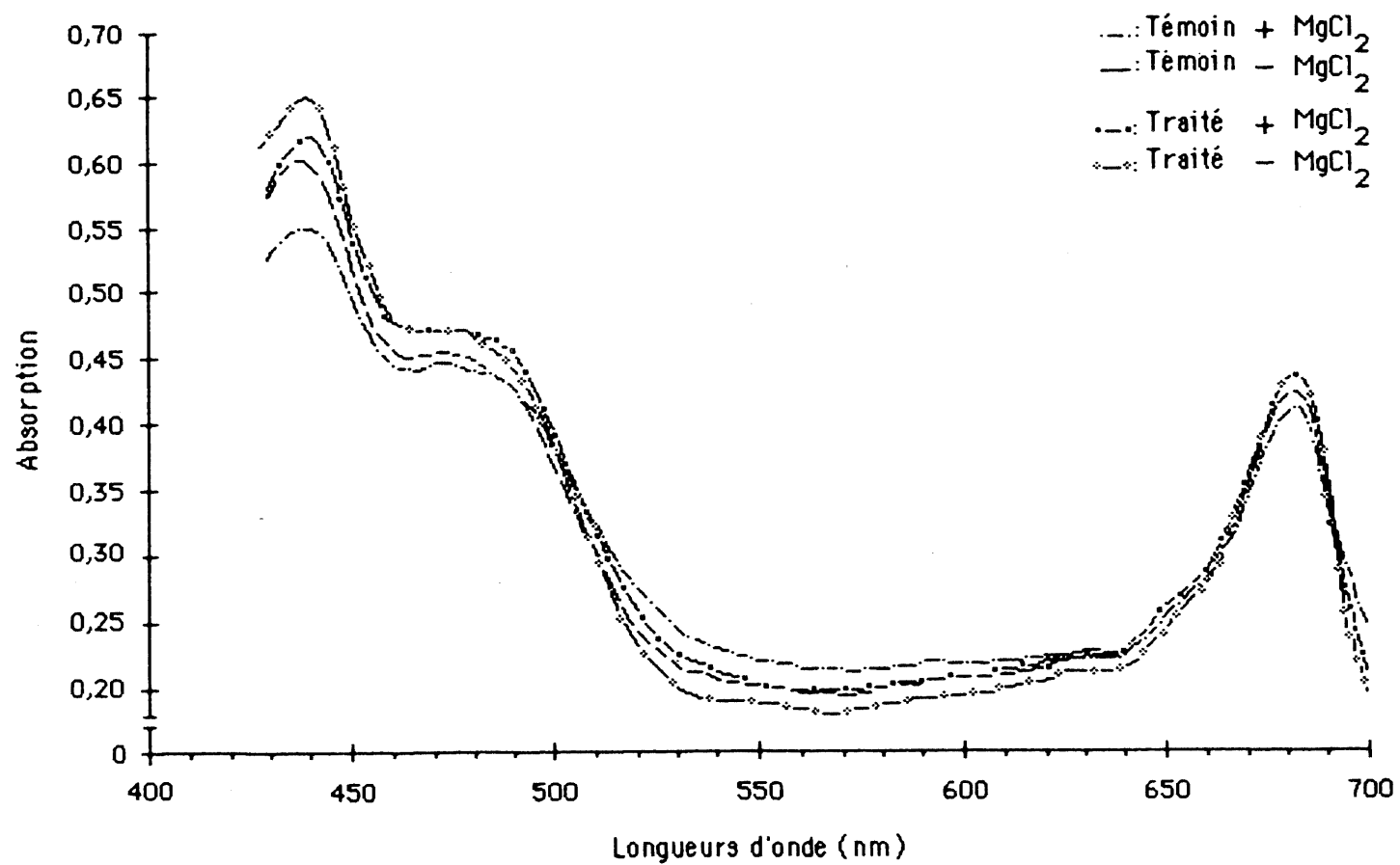


FIG. 1: Spectre d'absorption d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine en présence ou en l'absence de 1 mM de MgCl_2 .

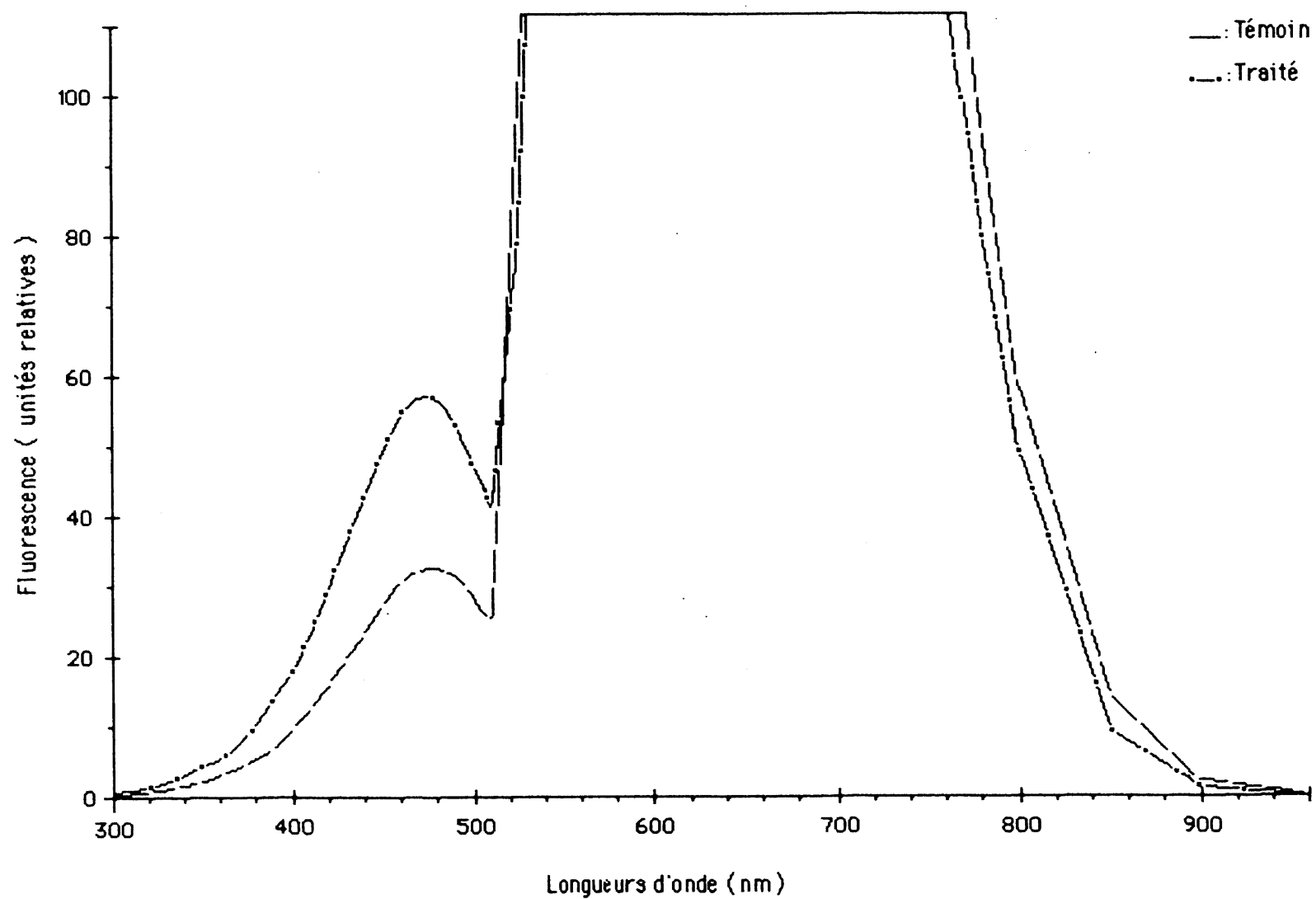


FIG. 2: Spectre d'excitation de fluorescence et de lumière diffusée d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (émission à 680 nm).

les chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine ont une fluorescence de 25 "unités relatives" supérieure à celle des chloroplastes de plantes témoins, soit une augmentation de plus de 50%. À 440 nm, cette différence est réduite à 20 unités, tandis qu'entre 500 et 900 nm, il y a une très grande diffusion de la lumière. Les spectres d'émission de la fluorescence des suspensions de chloroplastes provenant des plantes témoins ou traitées à l'atrazine, puis soumises à des longueurs d'onde d'excitation de 440 ou 470 nm, présentent une émission maximum à 680 nm (figure 3 A). Chez les chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine, il y a une émission de fluorescence chlorophyllienne de 30 à 35 unités supérieure à celle produite par les chloroplastes de plantes témoins aux longueurs d'onde d'excitation respectives de 440 ou 470 nm. L'excitation à 440 nm semble nettement avantageuse, car elle permet de minimiser la quantité de lumière diffusée par les extraits de chloroplastes de *L. minor* tout en contribuant à une meilleure résolution entre la région de la lumière diffusée et celle d'émission de la fluorescence. La présence de chlorure de magnésium à 1 mM dans les extraits de chloroplastes est sans effet sur la longueur d'onde de l'émission maximum, mais elle accroît d'environ dix unités l'intensité de l'émission à 680 nm chez les chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées à l'atrazine (figure 3 B).

3.2 Fluorescence et concentration de chlorophylle

Les chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine émettent davantage de fluorescence que ceux des plantes témoins pour des concentrations de chlorophylle variant de 1 à 20 µg/ml (figure 4). La fluorescence s'accroît très rapidement entre 1 et 5 µg de chlorophylle par ml, puis elle atteint un seuil

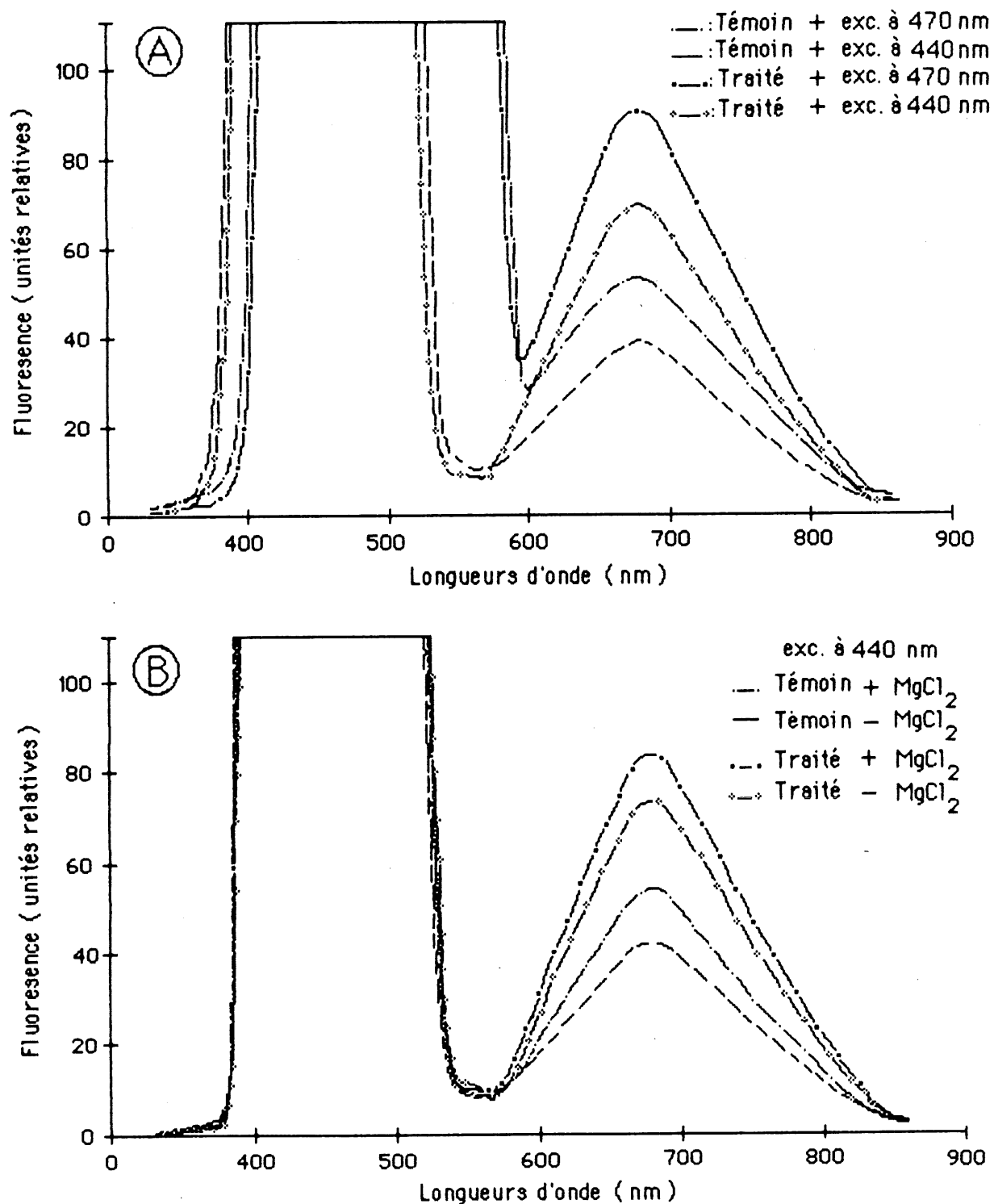


FIG. 3: Spectre d'émission de fluorescence et de lumière diffusée d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine et excitée à deux longueurs d'onde différentes (A) en présence ou en l'absence de 1 mM de $MgCl_2$ (B)

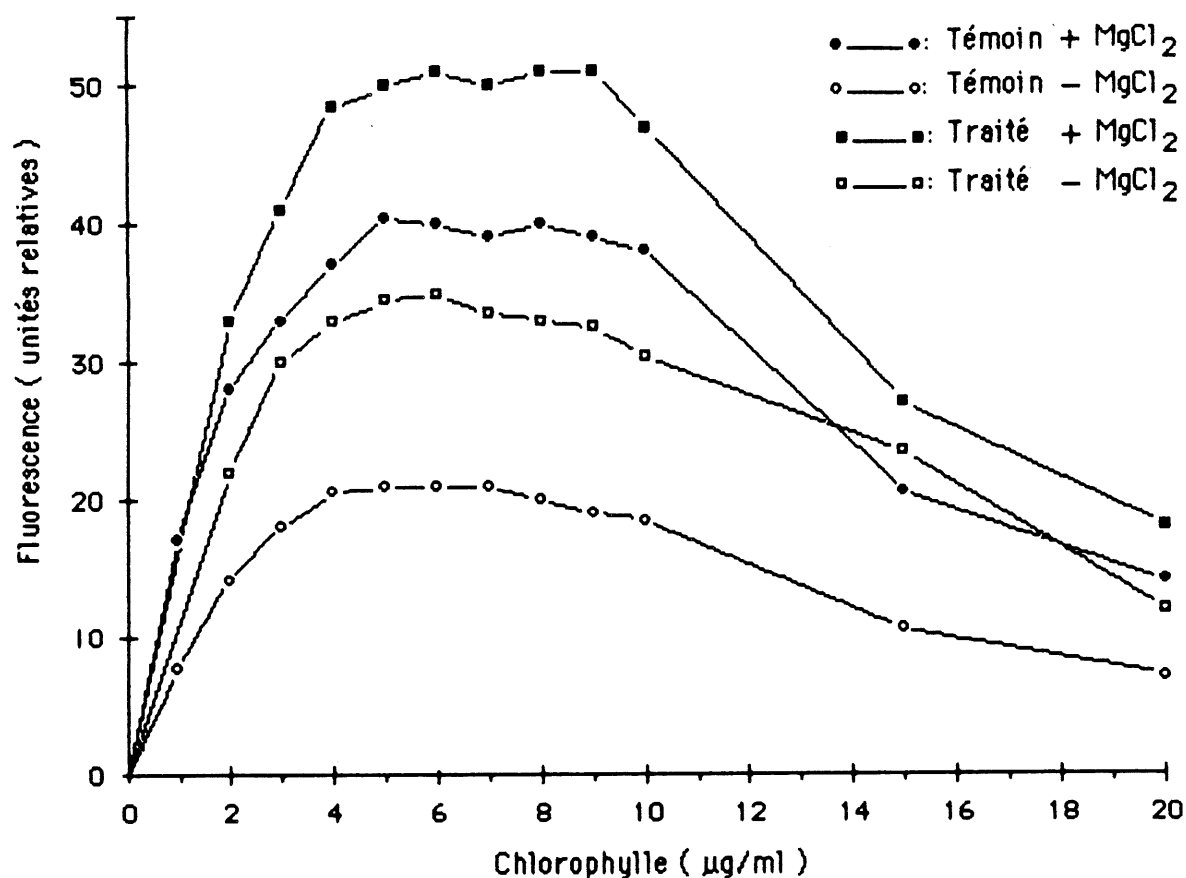


FIG. 4: Intensité relative de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine pour différentes quantités de chlorophylle totale (a+b) en présence ou en l'absence de 1 mM de MgCl_2 .

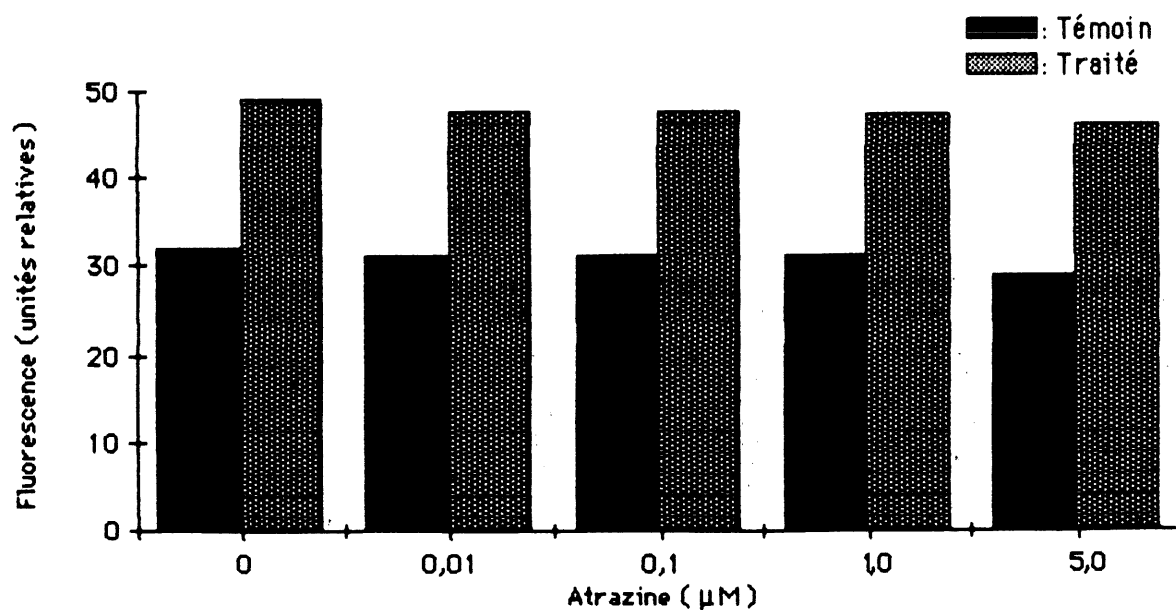


FIG. 5: Effet de l'atrazine *in vitro* sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine.

maximum entre 5 et 9 $\mu\text{g/ml}$. À ces dernières concentrations de chlorophylle, les extraits de chloroplastes de plantes traitées produisent près de deux fois plus de fluorescence que ceux de plantes témoins. L'ajout de 1 mM de chlorure de magnésium au milieu de suspension des chloroplastes de plantes témoins et traitées à l'atrazine amène une augmentation d'environ 50% de la fluorescence à des concentrations de chlorophylle de 5 à 9 $\mu\text{g/ml}$. Aux concentrations élevées en chlorophylle au-delà de 10 $\mu\text{g/ml}$, il se produit un important "quench" ou auto-absorption de la fluorescence chlorophyllienne à 680 nm.

3.3 Influence de l'atrazine *in vitro* sur l'émission de la fluorescence

La présence d'atrazine *in vitro* dans le milieu de suspension des chloroplastes de *L. minor* témoins ou traitées à l'atrazine à doses sublétales durant leur croissance n'affecte pas l'intensité de la fluorescence émise (figure 5). Toutefois, pour les concentrations d'atrazine variant de 0 à 5 μM , les chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine émettent jusqu'à 60 % plus de fluorescence que ceux des plantes témoins.

3.4 Influence de concentrations variées de MgCl_2 et de KCl sur l'émission de la fluorescence

L'émission de la fluorescence en fonction de la concentration de magnésium semble répondre à une équation de régression de type " $y = ax^be^{-cx}$ " (COTHBERT & WOOD, 1980) où "y" représente la fluorescence émise et "x" la concentration de MgCl_2 en mM (figure 6). La courbe de prédiction représentant

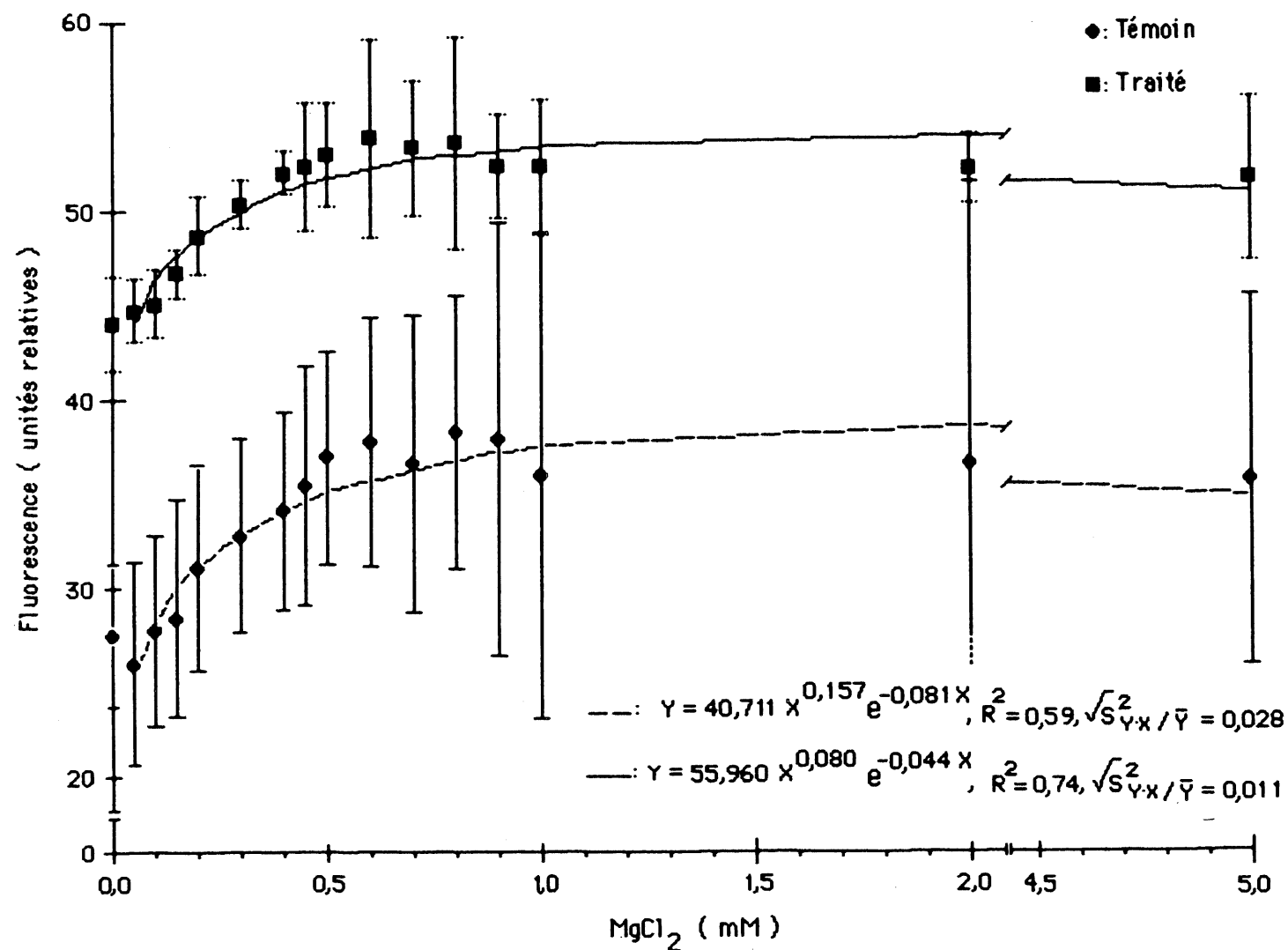


FIG. 6: Influence de concentrations variées de MgCl₂ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine.

Valeur moyenne de 3 répétitions par point avec intervalles de confiance à 95 % des moyennes.

l'émission de la fluorescence à 680 illustre mieux les résultats observés chez les extraits de chloroplastes de plantes traitées que chez ceux de plantes témoins (SOKAL & ROHLF, 1981; DRAPER & SMITH, 1981).

Le traitement des plantes à 0,25 ppm d'atrazine agit au niveau des chloroplastes en suspension dans le tampon Na-tricine à 25 mM et à pH 7,5 en favorisant de façon significative l'émission de la fluorescence à 680 nm en présence ou en l'absence de magnésium. Les maxima d'émission de la fluorescence s'observent entre 0,6 et 0,8 mM de $MgCl_2$ pour les chloroplastes de plantes témoins ou traitées à l'atrazine. A partir de 0,05 mM de chlorure de magnésium jusqu'aux concentrations causant une émission maximale, on note une augmentation de l'intensité de la fluorescence de 12,5 unités chez les chloroplastes de plantes témoins et de 9 unités chez les chloroplastes de plantes traitées. Ces stimulations correspondent à une augmentation de 48% pour les chloroplastes de *L. minor* témoins et de 20% pour ceux des plantes traitées.

L'influence de concentrations variées de KCl sur l'émission de la fluorescence de la suspension de chloroplastes est illustrée à la figure 7. La courbe de régression sélectionnée du même type que précédemment illustre les résultats obtenus avec une précision comparable à ceux de la figure 6. Pour les deux groupes de chloroplastes, des concentrations de 0 à 15 mM de KCl causent une légère diminution de la fluorescence jusqu'à un seuil minimum situé entre 15 et 20 mM. La courbe de régression se limite donc aux valeurs de concentrations de 15 à 150 mM de KCL. La fluorescence émise par les

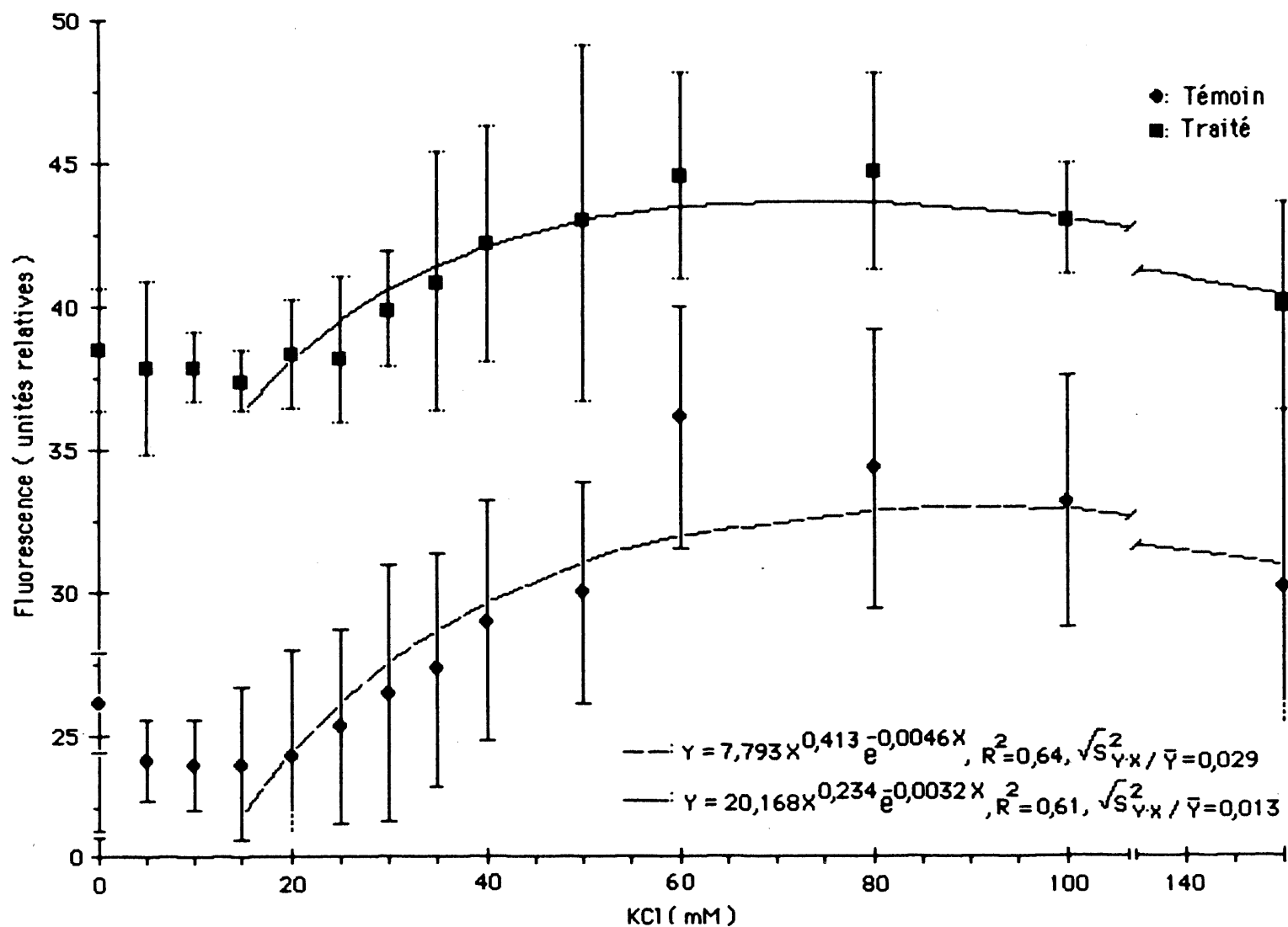


FIG. 7: Influence de concentrations variées de KCl sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine.

Valeur moyenne de 3 répétitions par point avec intervalles de confiance à 95 % des moyennes.

chloroplastes éclatés des plantes traitées est significativement plus élevée que celle des plantes témoins pour la majorité des concentrations de chlorure de potassium étudiées.

Pour l'ensemble des concentrations en chlorure de potassium étudiées, les chloroplastes des plantes traitées produisent de 30 à 50% plus de fluorescence. Les maxima d'émission de la fluorescence s'observent entre 60 et 100 mM de KCl pour les chloroplastes de plantes témoins et entre 60 et 80 mM chez ceux de plantes traitées. Il est donc nécessaire d'utiliser des concentrations de chlorure de potassium au moins 40 fois supérieures à celles du chlorure de magnésium pour obtenir une émission maximale de fluorescence. A partir de 15 mM de chlorure de potassium jusqu'aux concentrations causant une émission maximale, on note une augmentation de l'intensité de la fluorescence de 10,7 unités chez les membranes des plantes témoins et de 7,3 unités chez celles des plantes traitées. Ces variations correspondent à une augmentation de 50% pour les chloroplastes de *L. minor* témoins et de 20% pour ceux de *L. minor* traitées.

3.5 Effets du pH et du $MgCl_2$ sur l'émission de la fluorescence

Le pH du milieu de la suspension de chloroplastes éclatés de *L. minor* témoins ou traitées par 0,25 ppm d'atrazine exerce une très grande influence sur l'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 680 nm (figure 8). En l'absence de magnésium, le maximum de la fluorescence émise par les chloroplastes de plantes témoins ou traitées est atteint entre les pH 5 à 7,

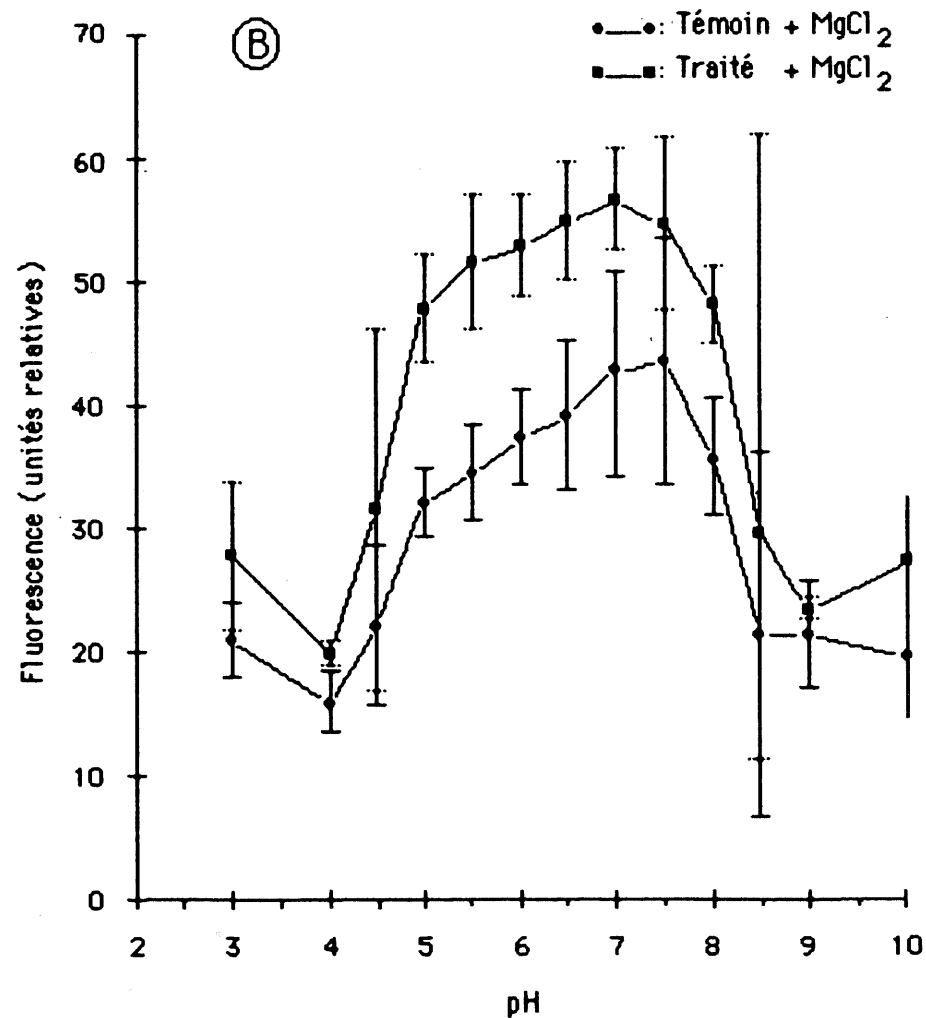
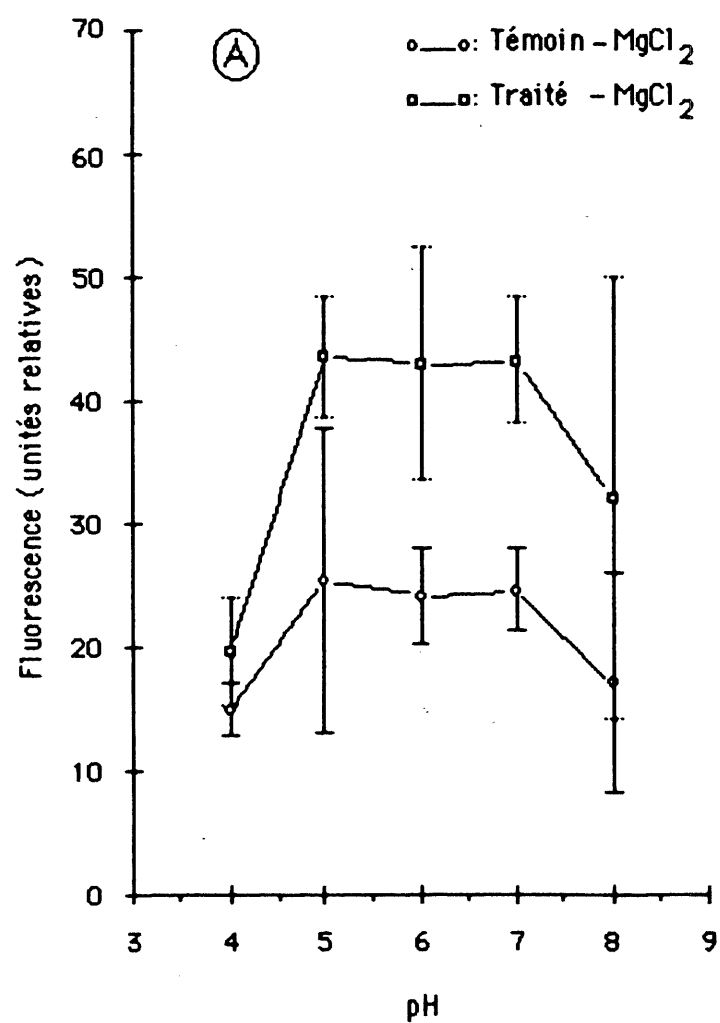


FIG. 8: Influence du pH sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine en l'absence (A) et en présence de 1 mM de MgCl_2 (B).

Valeur moyenne de deux répétitions (A) et 3 répétitions (B) avec intervalles de confiance à 95 % des moyennes.

tandis qu'elle est réduite considérablement aux pH extrêmes de 4 et 9 (figure 8 A). Dans la région de la courbe située entre les pH 5 et 7, les chloroplastes de plantes traitées se distinguent de leurs homologues témoins en émettant plus de 20 unités de fluorescence. En présence de $MgCl_2$, les chloroplastes ont tendance à atteindre leur seuil maximum d'émission de fluorescence vers les pH 7 à 7,5 (figure 8 B). De même, la différence entre la lumière émise par les chloroplastes de plantes témoins et par ceux de plantes traitées s'atténue de 10 à 15 unités de pH 5 à pH 8. Dans la région des courbes de pH situées près de la neutralité, les chloroplastes de *L. minor* traitées par 0,25 ppm d'atrazine émettent significativement plus de fluorescence à 680 nm que ceux des plantes témoins. Nous présentons à l'annexe 6 des résultats complémentaires de l'influence du magnésium sur l'émission de la fluorescence des chloroplastes de plantes témoins ou traitées à l'atrazine en suspension dans le tampon Na-tricine à 25 mM à pH 7 et à pH 8.

3.6 Influence de l'atrazine sur l'activité photosynthétique du photosystème II

L'activité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse des chloroplastes s'exprime par une courbe de régression et l'influence de l'atrazine est mise en évidence lorsqu'on compare les pentes des droites. L'activité photosynthétique des chloroplastes de plantes témoins ne diffère pas de façon significative de celle des chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine selon le test de comparaison des moyennes. Par contre, l'activité photosynthétique des chloroplastes de plantes témoins ou traitées à l'atrazine, représentée selon l'équation de Michaelis-Menten (figure 9 A et annexe 9), se révèle

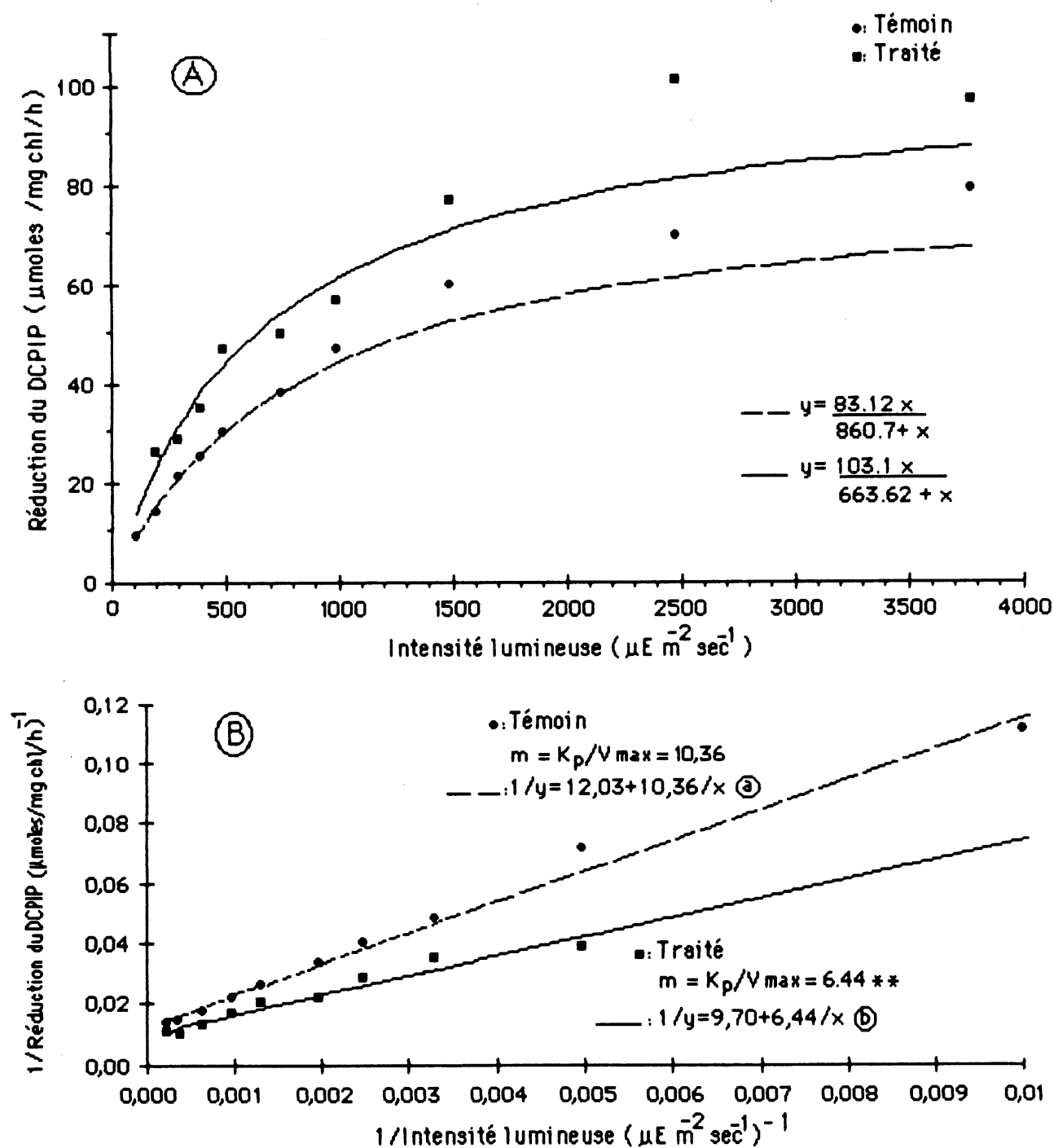


FIG. 9: Courbe de saturation lumineuse pour la réduction du DCPIP à 590 nm d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B). (activité du PS II)

** $P < 0,01$ (T'-test)

(A): $R^2=0,99$, $r=0,99$, $\sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,089$ (B): $R^2=0,95$, $r=0,98$, $\sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,118$

significativement différente. En effet, les résultats de trois essais distincts (figure 9 B et annexe 9) montrent des différences de pentes très significatives ($F = 46,18$, $Pr < 0,001$). Ainsi, pour chacune de ces expériences, les pentes calculées " V_{\max}/K_p " des membranes photosynthétiques traitées sont plus faibles que celles des membranes témoins déterminées par la méthode du T-test (SOKAL & ROHLF, 1981). En fait, l'atrazine accélère la "vitesse maximum" (V_{\max}) d'environ 6 % (observée: 18 %) et diminue la constante photochimique (K_p) de 38,5% (observée: $\approx 22,5\%$) des membranes photosynthétiques par rapport à celles des chloroplastes de plantes témoins. De même, les intensités moyennes de demi-saturation de l'activité photosynthétique sont de $507 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (observées: $\approx 600 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) pour les chloroplastes de plantes traitées et de $825 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (observées: ≈ 735) pour ceux de plantes témoins.

3.7 influence de l'atrazine sur l'activité photosynthétique du PS I

L'activité photosynthétique du photosystème I des membranes chloroplastiques a été mesurée chez les plantes témoins et chez les plantes traitées au cours de deux séries d'expériences (figure 10 et annexe 10). L'atrazine accroît très significativement les pentes " V_{\max}/K_p " des équations de Lineweaver-Burk sur le transport photosynthétique des électrons chez le PS I. L'atrazine semble provoquer une augmentation de 15% (observée: 6%) de la vitesse maximum et de la constante photochimique (K_p) qui s'accroît de 36,6% (observée: 38%; moyenne des deux répétitions). Ainsi à demi-saturation de leur activité photosynthétique, les chloroplastes de plantes traitées requièrent

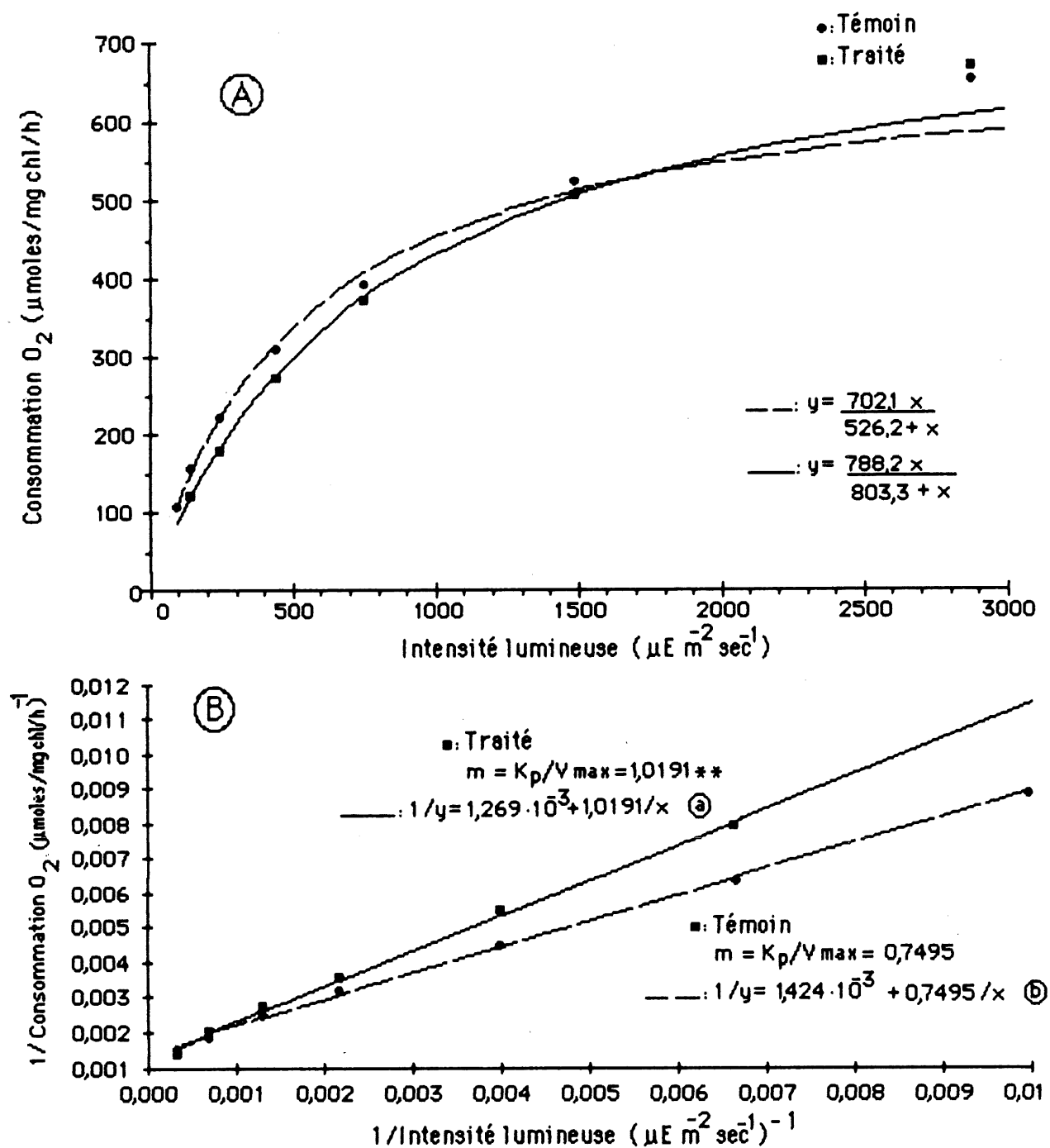


Fig. 10: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B). (activité du PS I)

** $P < 0,01$ (T-test)

(a): $R^2 = 0,99$, $r = 0,99$, $\sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,034$ (b): $R^2 = 0,99$, $r = 0,99$, $\sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,029$

"808 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ " (observé: $\approx 640 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) comparativement à "512 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ " (observé: $\approx 465 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) pour les chloroplastes de plantes témoins.

3.8 Influence de l'atrazine sur l'activité photosynthétique de la chaîne entière de transport des électrons.

L'analyse statistique des résultats ne permet pas de constater de différences pour le transport photosynthétique des électrons le long de la chaîne en raison de l'hétérogénéité des résultats. Les figures 11 A et 11 B représentent l'activité photosynthétique moyenne des chloroplastes de *Z. minor* de quatre répétitions, tandis que les essais individuels sont présentés à l'annexe 11. La vitesse maximum atteinte à saturation par les chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées par 0,25 ppm d'atrazine est en moyenne de "65 $\mu\text{moles O}_2 / \text{mg chl/h}$ " (observée: $\approx 65 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg chl/h}$) et l'intensité à demi-saturation est de "209 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ " (observée: $\approx 195 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ces valeurs sont nettement plus faibles que celles obtenues lors de l'étude du transport photosynthétique des électrons au niveau du PS I et du PS II.

Le pH de la suspension entraîne des changements importants de l'activité photosynthétique des chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées (figure 12). En présence ou en l'absence de magnésium, l'activité photosynthétique maximum observée chez les deux groupes de chloroplastes se situe vers le pH 7,5, tandis qu'elle diminue considérablement aux pH de 6,5 et 8,5. De pH 6,5 à pH 7,5, en l'absence de magnésium, l'activité photosynthétique s'accroît de plus de 300% chez les chloroplastes de plantes

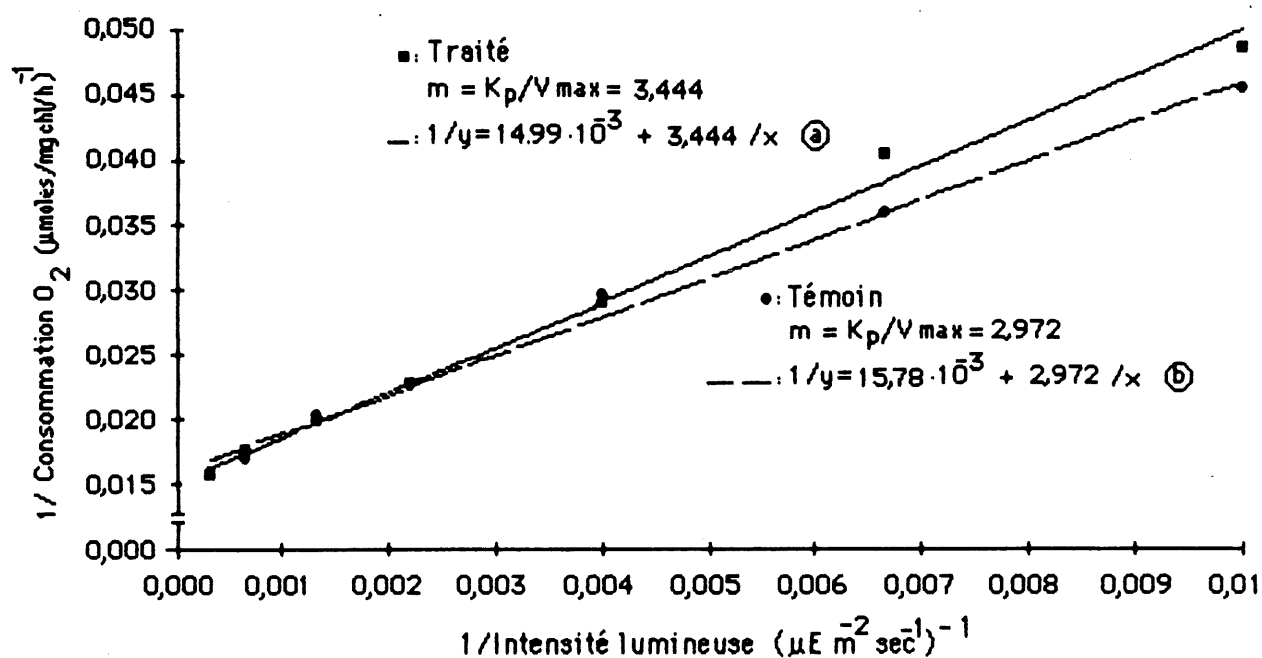
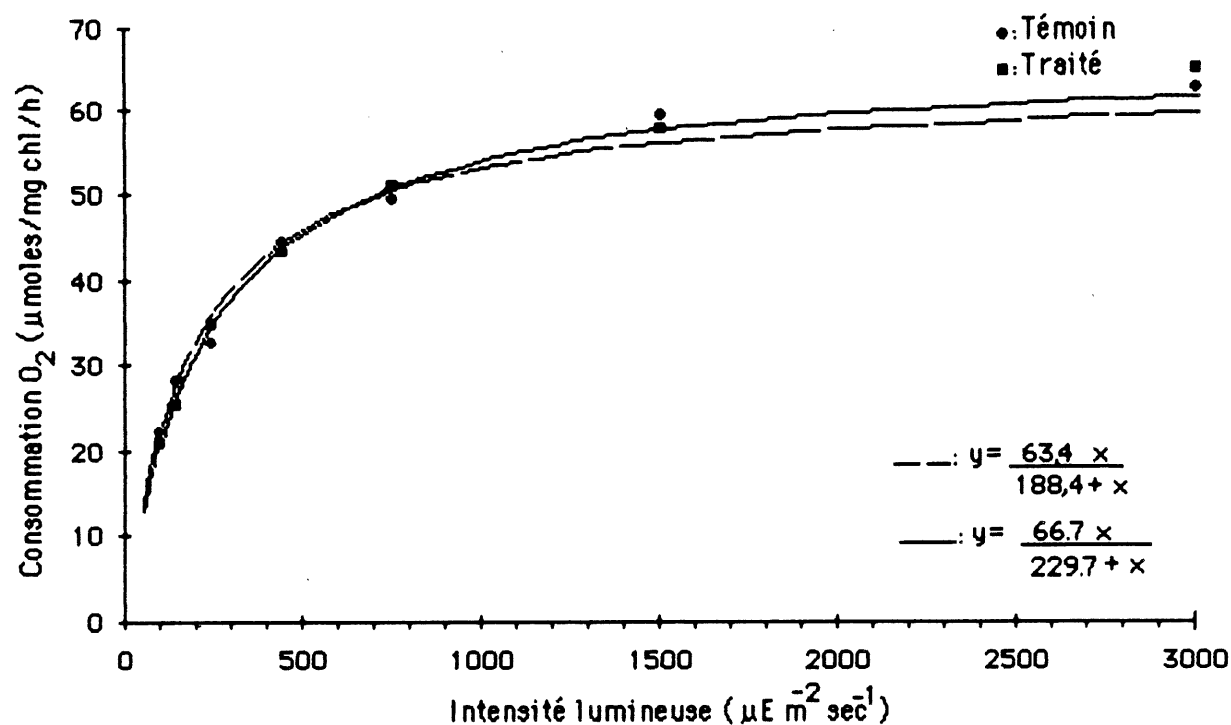


FIG.11: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B). (activité de la chaîne entière)

③: $R^2=0,97, r=0,95, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,043$ ⑥: $R^2=0,90, r=0,98, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,073$

(Moyenne de quatre répétitions par point)

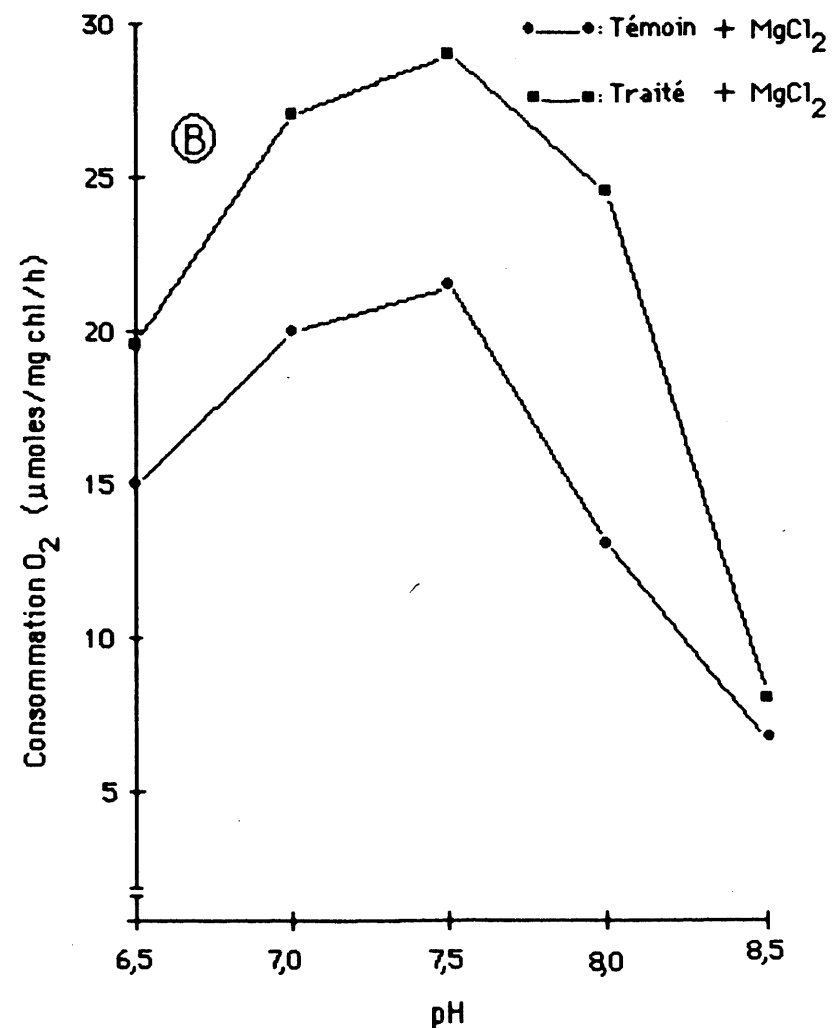
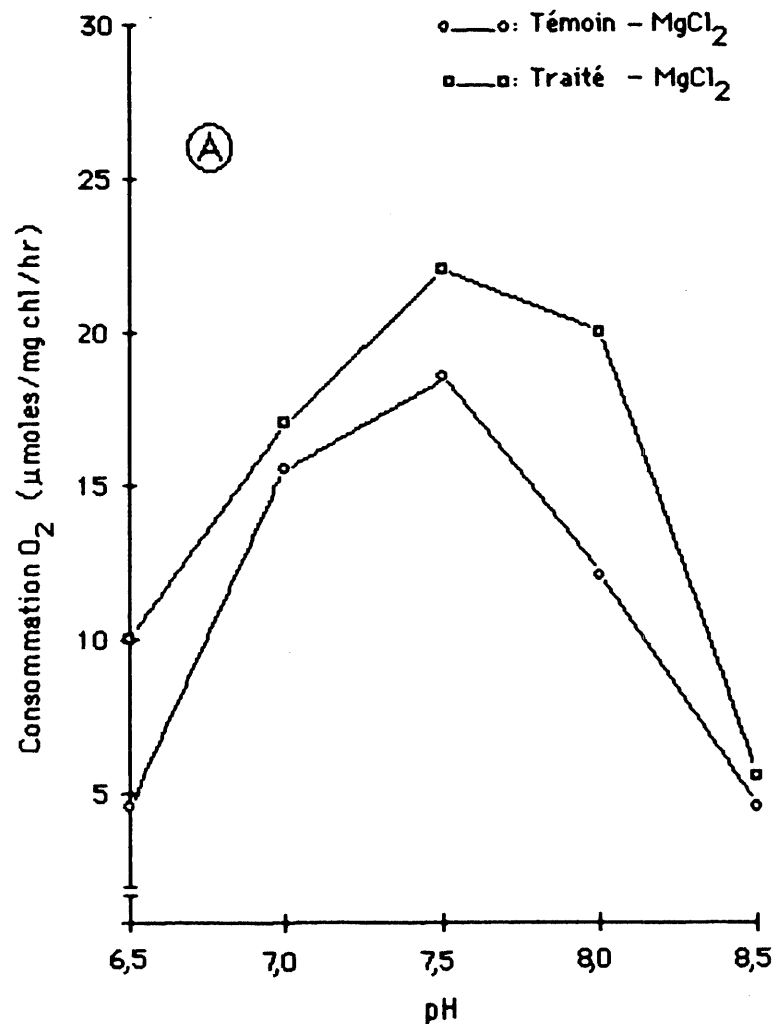


FIG. 12: Effet du pH sur la consommation d'oxigène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine lors de la mesure de l'activité photosynthétique de la chaîne entière en l'absence de MgCl₂ (A) et en présence de 1 mM de MgCl₂. (Milieu d'essai similaire à la figure 1)

Moyenne de deux répétitions par point; intervalles de confiance à 95% des moyennes se recoupent pour tous les points (non significatives). (essais effectués à 500 μ E m⁻² sec⁻¹).

témoins et de près de 120% chez ceux de plantes traitées. De plus, la présence de magnésium semble stimuler le rendement photosynthétique chez les chloroplastes de *L. minor* témoins et ceux de *L. minor* traitées. En fait, le magnésium stimule la consommation d'oxygène de plus 15% chez les chloroplastes de plantes témoins à pH 7,5 (de 18 à 21 $\mu\text{moles O}_2/\text{mg chl/h}$) contre 32% chez les chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine (de 21,5 à 28,5 $\mu\text{moles O}_2/\text{mg chl/h}$).

3.9 Détermination de l'inhibition à "50%" (I_{50}) de l'activité photosynthétique du PS II par l'atrazine *in vitro*.

La présence d'atrazine dans le milieu de réaction à des concentrations de 1 à 5 μM inhibe très fortement la photosynthèse des chloroplastes de plantes témoins ou traitées (figure 13 A). Les chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine présentent, pour des concentrations d'atrazine inférieures à 0,5 μM , des activités supérieures à celle des chloroplastes de plantes témoins. En fixant à 100 % l'activité en l'absence d'atrazine (selon les résultats de la figure 13 B), la valeur du I_{50} des chloroplastes de plantes témoins est estimée à $0,35 \pm 0,13 \mu\text{M}$, tandis que celui des chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine serait de $0,64 \mu\text{M} \pm 0,24 \mu\text{M}$. L'activité du photosystème II est réduite à 5% en présence de 5 μM d'atrazine à la fois chez les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées.

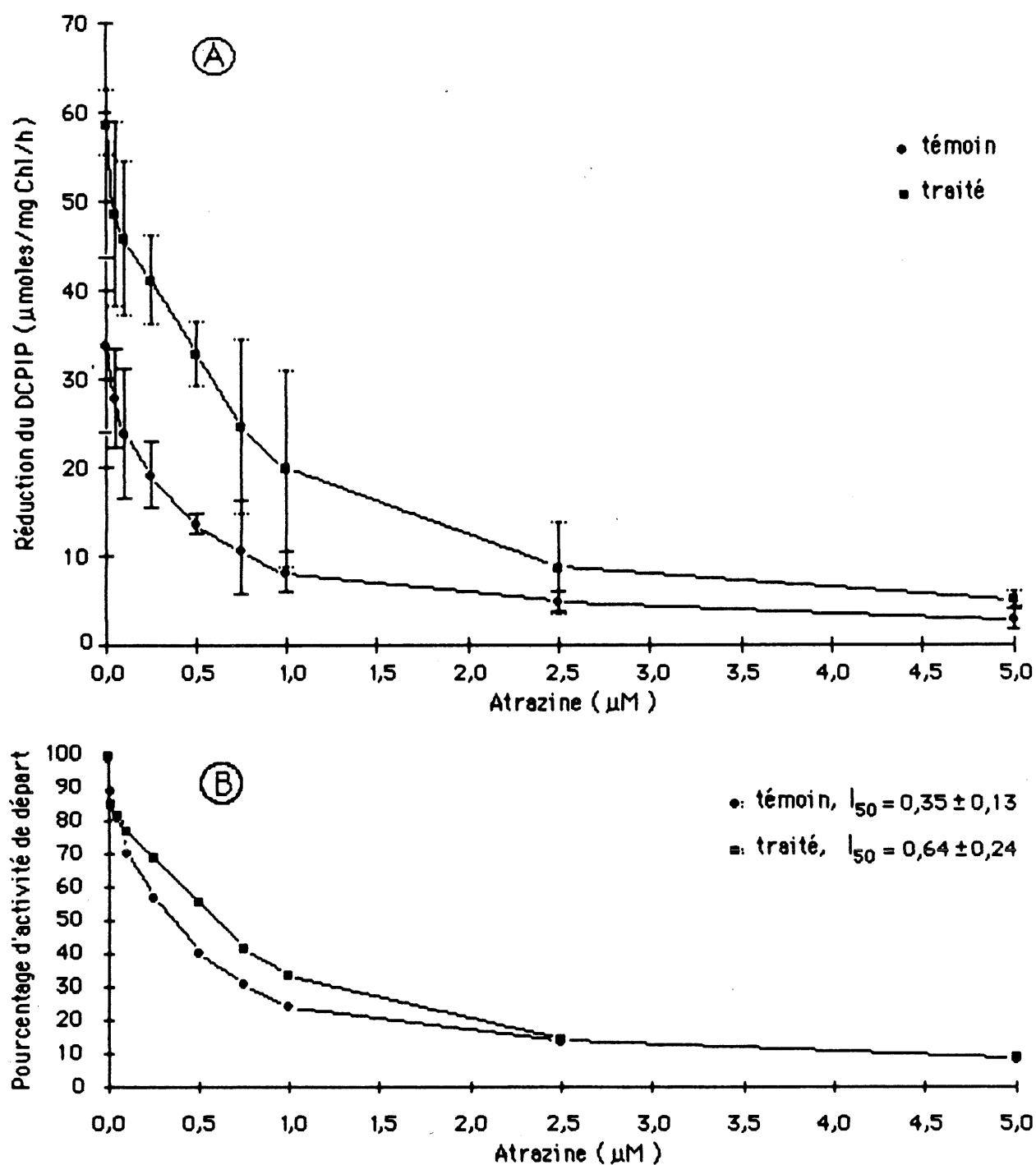


FIG.13: Effet de concentrations variées d'atrazine sur le taux de photoréduction du DCPIP par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine (A) et résultats exprimés selon le pourcentage de l'activité de départ (B).

Valeur moyenne de 3 répétitions par points avec intervalle de confiance à 95 % des moyennes. (essais effectués à $750 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)

CHAPITRE 4

DISCUSSION

La présence d'atrazine à doses sublétales dans le milieu de culture de la *Lemna minor* ne modifie pas le spectre d'absorption (visible, 430-700 nm) de chloroplastes en suspension dans le tampon Na-tricine. Ce spectre est semblable à ceux obtenus chez l'épinard (DUFRESNE, 1978), la fève (KIRK & TILNEY, 1978) et le blé (KUANG & al., 1980). Les spectres présentent deux bandes d'absorption. La plus large, située dans la région du bleu-violet (bande de Soret), est commune à tous les dérivés porphyrines. Elle affiche un maximum d'absorption à 440 nm. Ce pic coïncide *in vivo* chez la plupart des plantes au maximum d'absorption de la chlorophylle a. A cette longueur d'onde, d'autres pigments, dont la chlorophylle b et les caroténoïdes (β -carotène), participent à l'absorption. De plus, le décalage du maximum d'absorption dans la région du rouge du spectre causé par la chlorophylle b et les caroténoïdes amène l'épaulement de la bande vers 470 nm. La seconde bande, située dans la région du rouge du spectre visible, serait indicatrice de la présence de chlorophylles a et b. Dans cette région du spectre, *in vivo*, la chlorophylle a, sous plusieurs formes, absorbe préférentiellement entre 670 et 680 nm, tandis que la chlorophylle b absorbe surtout autour des 650 nm (RABINOWITCH, 1958; RABINOWITCH & GOVINDJEE, 1969; DUFRESNE, 1978).

Les faibles écarts dans l'amplitude des bandes observés dans le visible sur les spectres d'absorption provoqués par l'atrazine ne proviendraient pas d'une variation de la proportion des différents pigments associés aux

membranes thylakoïdiennes. En fait, LAROCHE (1983) a montré que le traitement à l'atrazine ne modifie pas le rapport Chl a/b des membranes thylakoïdiennes isolées et purifiées des chloroplastes de *Lemna minor*; malgré d'importantes modifications ultrastructurales des membranes (BEAUMONT & al., 1980) et une augmentation de 28 % du contenu en chlorophylle totale (a+b) (BEAUMONT & al., 1976 a). De plus, aucune preuve expérimentale n'a, jusqu'à présent, permis de suggérer l'existence d'un effet particulier des inhibiteurs de la réaction de Hill sur la synthèse des caroténoïdes (MORELAND, 1980).

Les différences minimales entre les spectres d'absorption des membranes photosynthétiques des plantes témoins et des plantes traitées pourraient être attribuables à des changements dans la répartition spatiale des pigments des thylakoïdes à cause d'une réorganisation ultrastructurale. En fait, ces variations s'apparentent à celles causées par l'ajout de cations dans le milieu de suspension des membranes photosynthétiques. Les cations, en intervenant sur l'empilement granaire et la répartition des photosystèmes, provoqueraient des modifications dans l'aire de projection des membranes photosynthétiques influençant ainsi l'absorption (KUANG & al., 1980). L'accumulation des pigments associés au PS II et le masquage des thylakoïdes entre eux sont liés à une diminution du nombre de quanta absorbés par le PS II comparativement au PS I (DUYSENS, 1950; JENNINGS & ZUCHELLI, 1985). Les écarts minimales entre les spectres d'absorption pourraient être aussi expliqués par la diffusion de la lumière par les interfaces chloroplastiques (diffusion de Rayleigh, diffusion spectrale sélective: LATIMER, 1959; GOVINDJEE & al., 1973; DUFRESNE, 1978). À ce sujet, on peut observer que le phénomène est plus prononcé vers les

courtes longueurs d'onde de la région du spectre visible. Bien qu'il existe une relation entre la lumière diffusée et l'ultrastructure des chloroplastes (MURAKAMI & PACKER, 1969; WOLLMAN & DINER, 1980), les travaux de JENNINGS & ZUCHELLI (1985) indiquent que l'augmentation de la lumière diffusée provoquée par l'ajout de glycérol n'affecte pas l'absorption de suspensions de chloroplastes. Les faibles écarts d'absorption entre les deux groupes de chloroplastes ne sont pas de nature à influencer la fluorescence, puisque des suspensions de chloroplastes de plantes traitées, dont le contenu en chlorophylle totale est jusqu'à deux fois inférieur à celui des suspensions de chloroplastes de plantes témoins, émettent davantage de fluorescence. La présence de la lumière diffusée est apparente sur les spectres d'excitation et d'émission, mais la bande de lumière diffusée est toutefois suffisamment éloignée du pic pour ne pas affecter la fluorescence.

Le traitement à l'atrazine ne provoque pas de variations des valeurs de longueurs d'onde maxima d'excitation et d'émission de fluorescence. L'excitation à la longueur d'onde de 474 nm, suivie de l'émission à 680 nm permettent une fluorescence maximale des suspensions de membranes photosynthétiques. À la température ambiante, la fluorescence à 680 nm provient des molécules de chlorophylle a-678 (voir chapitre 1). Puisque l'excitation à 474 nm correspond à l'absorption préférentielle des molécules de chlorophylle b, cela suggère un transfert efficace des excitons (par résonance) des chlorophylles b vers les chlorophylles a. La fluorescence "sensibilisée" de la chlorophylle a fut établie par DUYSENS en 1952. Aux environs de 470 nm, la lumière est absorbée préférentiellement par les LHC II. Pour séparer convenablement le pic de lumière diffusée du pic de fluorescence, nous avons en

général excité les suspensions de chloroplastes à 440 nm. Dans cette région du spectre visible, la lumière est absorbée par les centres réactionnels du PS II et par les LHC II (JENNINGS, 1984).

Aux longueurs d'onde produisant la fluorescence maximale, les chloroplastes de plantes traitées émettent près de 50% plus de fluorescence comparativement à ceux des plantes témoins. Par ailleurs, l'ajout d'atrazine à diverses concentrations dans le milieu de suspension de chloroplastes extraits de plantes témoins ou traitées ne provoque pas de variations appréciables dans l'émission de fluorescence. L'émission de la fluorescence de feuilles incubées en présence d'atrazine s'accroît progressivement avec le temps et à un rythme supérieur à celui des espèces résistantes à cet herbicide (ALI & MACHADO, 1981; AHRENS & al., 1981). La diffusion des inhibiteurs de la réaction de Hill, comme l'atrazine et le DCMU, jusqu'aux chloroplastes provoque une augmentation de l'énergie d'excitation émise sous forme de fluorescence, laquelle est associée à la fermeture graduelle des "trappes" des centres réactionnels du PS II (RICHARD & al., 1983). Selon nos résultats, l'augmentation de la fluorescence chez les suspensions de chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine ne saurait être imputable à une plus grande proportion de "trappes fermées" à cause de la présence résiduelle d'atrazine au niveau des membranes photosynthétique des chloroplastes. La stabilité de la fluorescence en présence d'atrazine nous indique que la source lumineuse (lampe au xénon, 450 W) est suffisamment puissante pour provoquer la fermeture complète des "trappes", ce qui détermine une émission maximale de fluorescence (F_{MAX}) par les deux groupes de chloroplastes (MURATA et al.,

1970; GROSS & HESS, 1973). Par conséquent, l'augmentation de l'intensité de la fluorescence observée chez les plantes traitées ne provient pas d'une variation du taux de photoréduction de l'accepteur primaire d'électrons du PS II. De plus, l'absence du transport photosynthétique des électrons favorise aussi la fermeture des trappes.

Nous ne disposons pas des moyens techniques pour quantifier la valeur de F_0 . Des doses sublétales sont sans effet sur la cinétique d'induction de la fluorescence, ainsi que dans la valeur du F_0 des segments de feuilles d'*Amaranthus* et de *Chenopodium* dont les graines furent imbibées en présence d'atrazine (VAUGHN & DUKE, 1984). Par contre, la présence de cet herbicide provoque une augmentation du volume occupé par les grana par rapport au volume du stroma et des lamelles du stroma. Aussi, le nombre de thylakoïdes par grana augmente chez les plantes traitées par 0,25 ppm d'atrazine (BEAUMONT & al., 1980; LAROCHE, 1983). Ces transformations se rapprochent de celles observées chez les espèces résistantes à l'atrazine lesquelles, par ailleurs, sont de même nature que celles observées chez la plupart des plantes traitées à doses sublétales (MATTOO & al., 1984b).

Pour toutes les concentrations de cations étudiées (0 à 5 mM de $MgCl_2$; 0 à 150 mM de KCl), les chloroplastes de *Lemna minor* traitées à l'atrazine émettent plus de fluorescence comparativement à ceux des *L. minor* témoins. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la fluorescence observée dans le cadre de cette étude n'est pas la conséquence de l'augmentation du contenu en cations du stroma des chloroplastes de plantes traitées. Dans un tel cas, aux

fortes concentrations, la différence d'intensité de la fluorescence émise par les deux groupes de chloroplastes apparaîtrait minime. Pour des concentrations élevées de cations, l'empilement granaire est maximal (JENNINGS & al., 1978, 1981; GEROLA, 1981). De même, il existe une relation entre l'émission de la fluorescence à la température ambiante (aux environs de 24 ° C) et les modifications ultrastructurales reliées à l'empilement des membranes thylakoïdiennes. En effet, l'augmentation de l'empilement granaire provoque une augmentation de la fluorescence émise à 680 nm par les chloroplastes (MURAKAMI & PACKER, 1971; ARGYROUDI-AKOYUNOGLU & AKOYUNOGLU, 1977; MULLET & ARNTZEN 1980; BARBER, 1980; CHOW & al., 1981). Bien que nous ne possédions aucune confirmation grâce à la microscopie électronique, nous croyons que les modifications ultrastructurales des membranes photosynthétiques de *L. minor* traitées à l'atrazine (BEAUMONT & al., 1980) ne proviendraient pas de changements dans le contenu en cations du stroma. Ajoutons que, selon BEN HAYYIN & KRAUSE (1980), le degré d'empilement granaire varie peu *in vivo* et doit être maximal. En effet, la concentration de magnésium présent dans le stroma des chloroplastes se situe entre 1 et 4 mM à l'obscurité et atteint de 3 à 9 mM à la lumière, alors que l'empilement granaire est un phénomène qui atteint sa saturation à des concentrations de magnésium équivalentes à 2 mM de $MgCl_2$ (BRIANTAIS, 1982). De ce fait, les observations de BEAUMONT & al. (1980) *in vivo* sur l'ultrastructure des chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées peuvent être considérées comme montrant un maximum d'accolement des membranes thylakoïdiennes.

La présence de cations amène une séparation spatiale des photosystèmes au moment de l'empilement granaire (BARBER, 1980, 1982). La redistribution des photosystèmes provoquerait une augmentation de la fluorescence en accentuant le transfert d'excitons entre les PS II, les LHC II et les PS I entre eux, tout en diminuant ceux du PS II vers le PS I (spillover: BUTLER & KITAJIMA, 1975; JENNINGS & al., 1980a; BRIANTAIS, 1982). L'efficacité des transferts d'énergie entre les photosystèmes est de nature à influencer l'intensité de la fluorescence et dépend de la distance séparant les chromophores, ainsi que de leur orientation parmi les pigments (MULLET & al., 1981). Il apparaît alors possible que le traitement à l'atrazine, tout en favorisant le développement de grana (BEAUMONT & al., 1980; LAROCHE, 1983) provoque également des modifications dans la distribution de l'énergie d'excitation et, par conséquent, dans l'émission de la fluorescence. Toutefois, il semble que le mécanisme, basé sur la séparation spatiale des photosystèmes, ne puisse expliquer à lui seul l'augmentation de la fluorescence chez les chloroplastes de *L. minor* traitées par 0,25 ppm d'atrazine puisque, en présence de faibles ou de fortes concentrations de cations, la différence d'intensité entre les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées aurait été minime.

Le contenu en chlorophylle de chacun des photosystèmes et la proportion des PS I et II sont de nature à influencer les transferts d'excitons et l'émission de fluorescence (MALKIN & KOK, 1966; MANNAN & BOSE, 1985). Le traitement à l'atrazine provoque une diminution du pourcentage des chlorophylles retrouvées dans le CP I et l'augmentation de celui du LHC II chez les chloroplastes de plantes traitées (LAROCHE 1983). De tels changements

sont susceptibles d'influencer la fluorescence (LASKAY & LEHOCZKI, 1986). Rappelons qu'à 24 ° C, la fluorescence à 680 nm provient des LHC II et qu'une augmentation de la capacité d'absorption à ce niveau pourrait se traduire par une augmentation de la fluorescence émise. Des changements dans la composition lipidique des membranes, comme l'indice d'insaturation des acides gras et le contenu en phospholipides, sont susceptibles d'influencer l'émission de la fluorescence (VENEDIKOV & KRIVOSHEJEVA, 1983; JORDAN & al., 1983; LYNCH & THOMPSON, 1984). L'atrazine augmente, sur une base de chlorophylle, le contenu de tous les lipides polaires des sous-unités photosynthétiques de la *Lemna minor* (GRENIER, 1987). De plus, le traitement à l'atrazine provoque une augmentation de l'insaturation de la majorité des groupes de lipides des membranes thylakoïdiennes (LAROCHE, 1983). Selon SIEGEL & al., (1981), l'ajout de lipides polaires, comme les PC et les PG, aux membranes thylakoïdiennes contribue à augmenter la fluorescence à 685 nm. Une augmentation de la quantité de diacylgalactosylglycérol et du contenu en acide linoléique aurait un rôle important dans l'interrelation entre la chaîne de transport des électrons et la conservation de l'énergie (LASKAY & LEHOCZKI 1986). L'incubation, sur une période de trente minutes à la température de la pièce, d'acide linoléique en présence d'une suspension de chloroplastes d'épinard entraîne une modification de l'orientation des protéines associées à un changement dans la fluidité des membranes. Cela est mis en évidence par l'étude du spectre de dichroïsme linéaire (SZITO & al., 1984). L'environnement lipidique des membranes exerce une très grande influence sur l'orientation des protéines et peut également entraîner un détachement des antennes des centres réactionnels qui est susceptible d'affecter la distribution de l'énergie d'excitation (SIEGEL & al, 1981). Nous ne pouvons pas, *a priori*, éliminer une

relation possible entre l'augmentation de la fluorescence par suite du traitement à l'atrazine et celle de tous les lipides polaires, ainsi que de leur indice d'insaturation.

En présence ou en l'absence de cations, plusieurs sources possibles de variations non mutuellement exclusives ont pu influencer les résultats. Les changements observés par LAROCHE (1983) dans la composition en chlorophylle des PS I et II, de même que dans la composition lipidique des membranes pourraient avoir une importance majeure dans l'augmentation de la fluorescence. Des études sur l'émission de la fluorescence pour les PS I et II à 77° K, ainsi qu'une étude de la cinétique d'induction de la fluorescence permettraient d'identifier avec plus de précision les principales sources de variations d'intensité de la fluorescence émise par les plantes témoins et les plantes traitées.

L'étude de la fluorescence à 77 ° K permettrait d'évaluer la fluorescence émise par chaque photosystème. En outre, c'est le rapport de la fluorescence associée au PS I à 735 nm sur celle du PS II à 680 nm à cette même température qui constitue la preuve évidente d'un changement dans la distribution de l'énergie d'excitation entre les photosystèmes. Par ailleurs, la cinétique d'induction de la fluorescence nous renseignera sur la fluorescence variable (F_v) qui est l'indicateur du nombre de chlorophylles actives dans ce transfert de l'énergie d'excitation vers les centres réactionnels du PS II. Elle nous renseigne également sur la fluorescence constante (F_o), indicatrice de la quantité de molécules de chlorophylle incapables de transmettre l'énergie

d'excitation aux centres réactionnels du PS II. Cette dernière méthode permettrait d'évaluer la quantité relative de l'accepteur primaire et secondaire d'électrons présent, en plus de renseigner sur le degré de liaison entre les centres réactionnels du PS II (GRIFFITH & al., 1984; DUYSSENS & al., 1984).

Les suspensions de chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine présentent une sensibilité au magnésium comparable à celle des plantes témoins. En effet, l'émission maximum de fluorescence par les chloroplastes de plantes traitées ne se produit que pour des concentrations légèrement inférieures à celles requises pour les chloroplastes de plantes témoins. En outre, nos résultats sur l'émission de la fluorescence se comparent à ceux obtenus chez d'autres espèces végétales. La concentration en magnésium qui provoque une augmentation maximale de la fluorescence est de l'ordre de 1 mM chez l'épinard (SEARLE & al., 1977), de 1 à 2 mM chez le pois (ARNTZEN & al., 1976; LIEBERMAN & al., 1978) et le maïs (LETO & ARNTZEN, 1981). Le calcium, de même valence que le magnésium, causerait des effets identiques aux mêmes concentrations (BARBER, 1977). Puisque l'efficacité des cations à provoquer l'empilement granaire est largement déterminée par leur valence (BARBER, 1977, 1980 & 1982), les concentrations de KCl nécessaires sont plus de 20 fois supérieures à celles requises par le $MgCl_2$ pour provoquer une émission maximale de fluorescence à la fois chez les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées à l'atrazine.

Les expériences de GROSS & PRASHER (1974) révèlent que lorsque des membranes thylakoïdiennes sont placées en suspension dans un milieu dépourvu

de cations (0,1 mM de sucrose et 0,2 mM de tris-base), on retrouve principalement des membranes granaires. L'ajout d'une faible quantité de cations monovalents (env. 3 mM) provoque la disparition de l'empilement granaire. Cependant, l'augmentation du contenu en cations monovalents entraîne à nouveau la formation de grana.

Ainsi, nous avons observé que l'intensité de la fluorescence varie très peu pour de faibles concentrations de KCl (0 à 15 mM), tandis que des concentrations élevées provoquent une diminution de la fluorescence. Ces changements sont beaucoup moins prononcés lorsque c'est le magnésium qui est utilisé. Il est reconnu que la fluorescence est maximale lorsque des chloroplastes sont isolés dans un milieu en présence de faibles quantités de cations et placés en suspension dans un milieu sans magnésium. L'ajout subséquent de 3 à 20 mM de KCl provoque une baisse de la fluorescence (GROSS & PRASHER, 1974; CHOW & al., 1981). En fait, dans un milieu qui contient très peu de magnésium, l'empilement granaire est maximum, ce qui expliquerait l'intensité élevée de la fluorescence (BARBER & CHOW 1979; BARBER, 1980). Dans notre cas, la concentration de tampon relativement élevée et l'emploi de NaOH pour l'ajustement du pH des solutions amène une quantité appréciable de cations dans le milieu et, par conséquent, la diminution de la fluorescence de 0 à 20 mM de KCl est beaucoup moins prononcée. Nous pouvons observer (annexe 5) que l'intensité de la fluorescence est élevée lorsque les chloroplastes sont placés en suspension dans un milieu contenant peu de cations ou de magnésium. Le quench de la fluorescence pour les concentrations élevées de KCl pourrait provenir de l'augmentation du taux de dissipation de l'énergie par conversion interne (BAKER & DOMINY, 1980).

Nous avons souligné que des concentrations voisines de magnésium (env. 0,6 à 0,8 mM) provoquent une émission maximale de la fluorescence chlorophyllienne par les suspensions de chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées par 0,25 ppm d'atrazine. Nous avons mentionné en introduction que les LHCP jouaient un rôle essentiel dans l'empilement granaire. Ainsi, selon nous, la réponse des membranes de chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées à l'atrazine concorde avec les résultats obtenus par LAROCHE (1983) sur le contenu protéique associé au LHC II. Chez les chloroplastes de plantes témoins, 80% des protéines membranaires se retrouvent au niveau des antennes collectrices de lumière pour le PS II contre 75% chez les chloroplastes de *Lemna minor* traitées à l'atrazine. Plusieurs études (BURKE & al., 1978, STEINBACK & al., 1979; GEROLA, 1981), notamment l'utilisation de plantes à divers stages de leur verdissement, indiquent que la présence des LHCP est nécessaire pour que se produise l'augmentation de la fluorescence par les cations, ainsi que les changements dans l'empilement granaire (DAVIS & GROSS, 1975). De plus, l'ajout de LHCP à des liposomes provoque l'agrégation des particules aux mêmes concentrations que celles nécessaires pour produire l'empilement granaire *in vivo* (RYRIE & al., 1980; MULLET & ARNTZEN, 1980).

L'augmentation d'intensité de la fluorescence, moindre en présence de concentrations saturantes de magnésium par les suspensions de chloroplastes de plantes traitées par rapport à celles de plantes témoins (unités relatives: 13.5 contre 10), semble indiquer une diminution du pouvoir de régulation par les cations dans la distribution de l'énergie d'excitation. L'amplitude de la stimulation par le Mg^{+2} est proportionnelle au contenu en LHCP des thylakoïdes

(LIEBERMAN & al., 1978; LETO & ARNTZEN 1978). Comme nous le savons, le traitement à l'atrazine modifie plus fortement la teneur en chlorophylle totale associée au LHC II que la teneur en protéines (LAROCHÉ, 1983). De même, l'élévation de la fluorescence émise en présence de faibles quantités de cations (c. à d. à 0,05 mM de $MgCl_2$) jusqu'au maximum émis (sur la courbe), correspond à une augmentation de 20% chez les plantes traitées et de 48% chez les plantes témoins. Bien que le traitement cause une diminution de la longueur totale des lamelles du stroma, il y a, par contre, une augmentation importante de la longueur totale des membranes périphériques des grana (LAROCHÉ, 1983). Les membranes périphériques seraient de même nature que les lamelles du stroma (ANDERSON, 1981; ANDERSSON & HAEHNEL, 1982; ANDERSON & MELIS, 1983). Selon BARBER (1980), l'augmentation de la fluorescence en présence de cations serait l'une des conséquences de la ségrégation spatiale des PS II dans les régions granaire non exposées au stroma et des PS I dans les régions exposées au stroma. Le rapport entre les membranes exposées au stroma et celles des régions accolées est très importante dans le déroulement du phénomène et pourrait à la rigueur expliquer nos résultats. Chez les chloroplastes de *L. minor* traitées par 0,25 ppm d'atrazine, il est aussi possible que la stimulation de la fluorescence par les cations soit limitée par la quantité élevée des membranes périphériques des grana. Ceci se justifie par le fait que l'augmentation d'intensité de la fluorescence provoquée par le Mg^{+2} puisse apparaître plus faible.

En l'absence de magnésium, des changements de pH de 5 à 7 n'affectent pas l'intensité de la fluorescence des suspensions de chloroplastes de plantes

témoins ou de plantes traitées par 0,25 ppm d'atrazine. Chez les deux groupes de chloroplastes, l'amplitude de l'intensité de la fluorescence en présence de cations augmente avec le pH et atteint son maximum pour des pH compris entre 7,5 et 8. De plus, l'augmentation de la concentration en H^+ du milieu de suspension des chloroplastes freine la stimulation de la fluorescence par le magnésium pour les deux groupes de chloroplastes. Contrairement au mécanisme d'accolement induit par masquage électronique en présence de cations, la neutralisation des charges par l'abaissement du pH ne nécessite pas une migration latérale des complexes chargés des membranes (BARBER & al., 1980). Les modifications structurales provoquées par la neutralisation totale des charges ne seraient pas accompagnées de changements dans la redistribution de l'énergie d'excitation, ce qui expliquerait l'absence de variations d'intensité de la fluorescence en l'absence de magnésium pour les pH compris entre 5 et 7,5. En l'absence de cations, l'empilement granaire maximum chez le pois se produit pour les valeurs de pH près de 4,3 (NAKATANI & al., 1978, 1979) et de 4,7 pour *Vicia faba* et *Lupinus luteus* L. (GROUZIS & al., 1982). Ces valeurs correspondent au point isoélectrique des membranes thylakoïdiennes, tandis qu'aux pH plus élevés, les membranes photosynthétiques portent un excès de groupements chargés négativement (NAKATANI & al., 1978). L'inhibition progressive de la stimulation de la fluorescence en milieu acide est vraisemblablement attribuable à la réduction de la densité de charges à la surface des membranes par la neutralisation induite par les H^+ . La réduction de la densité des charges à la surface des membranes provoquerait la diminution des changements électrostatiques exercés à la surface des membranes subséquentes à l'ajout de Mg^{+2} (BARBER & al., 1980; SCOUFFLAIRE & al., 1982). De même, une quantité plus faible de cations est nécessaire pour obtenir une

fluorescence maximale chez les deux groupes de chloroplastes s'il y a abaissement du pH du milieu de suspension en raison des charges déjà neutralisées (annexe 6). Dans les régions de la courbe légèrement basiques (\approx pH 7,5) ou acides (\approx pH 5), on assiste à une baisse rapide de la fluorescence émise tant en présence qu'en l'absence de cations. Ceci pourrait probablement être attribuable à la détérioration des LHC II provoquée par les pH extrêmes.

Le traitement à l'atrazine provoque des variations significatives dans l'activité photochimique du photosystème II des chloroplastes de *Lemna minor*. Pour toutes les expériences, les pentes " V_{\max}/K " sont significativement plus faibles pour les chloroplastes de plantes traitées par rapport à ceux des plantes témoins. En outre, le K_p , qui représente l'intensité lumineuse lorsque l'activité photosynthétique est à demi-saturation, diminue fortement chez les chloroplastes de plantes traitées, tandis que la vitesse maximum (V_{\max}), à saturation, augmente. Le " K_p " est analogue à la constante de Michaelis " K_m " en cinétique enzymatique (HUNER, 1984). Puisque la valeur de " K_p " dépend de la teneur en chlorophylle associée par pigment-piège (BAKER & HARDWICK, 1974; KYLE & ZALIK, 1982), la diminution significative de l'intensité lumineuse nécessaire pour obtenir saturation de la photoréduction du DCPIP chez les chloroplastes de *Lemna minor* traitées à l'atrazine semble se traduire par une augmentation de la taille du photosystème II. De même, cela pourrait aussi expliquer l'activité photosynthétique plus grande des plantes traitées aux faibles intensités lumineuses. Cette interprétation s'accorde avec les résultats obtenus par LAROCHE (1983), lesquels révèlent une augmentation du

rapport des pourcentages de chlorophylles entre les LHC II sur le CPa chez les chloroplastes de plantes traitées. L'efficacité relative de l'activité du PS II plus élevée aux faibles intensités lumineuses coïncide également avec l'augmentation observée de la fluorescence (MURATA, 1969). Cette interprétation est conforme aux résultats de LEMOYNE & al. (1986) qui, sur la base d'observations de la fluorescence à 77 °K, montrent que l'augmentation de l'intensité de la fluorescence à cette température coïncide avec une augmentation de la taille du PS II chez divers biotypes à la fois traités et résistants à l'atrazine. L'activité photosynthétique à de faibles intensités lumineuses dépend du taux d'absorption de la lumière par les chlorophylles des centres réactionnels. L'étape limitante, dans ces conditions, ne dépend ni de la quantité de donneurs ou de receveurs d'électrons, ni de la quantité de chloroplastes sur une base de chlorophylle, mais du taux d'absorption de la lumière qui serait fonction de la taille du photosystème, soit le nombre de molécules de chlorophylle par photosystème. Dans cette région de la courbe, le taux de renouvellement du centre réactionnel est contrôlé par le taux d'absorption de la lumière, tandis qu'à saturation par la lumière, une variation dans la distribution de l'énergie d'excitation ne pourrait affecter le rendement photosynthétique, les pièges étant déjà suralimentés. Il est fréquemment admis que la formation de grana affecte le rendement photosynthétique (JENNINGS & al., 1980). Il est toutefois difficile de distinguer entre les changements dans l'activité des photosystèmes liés aux variations de la distribution de l'énergie d'excitation et ceux liés à la composition membranaire ou à l'état d'oxydoréduction de certains éléments de la chaîne de transport des électrons (BOSE & ARTZEN, 1978; BOSE & al., 1981; RAMANUJAM & BOSE, 1983).

L'augmentation de la photoréduction du DCPIP à saturation lumineuse suggère que le traitement à l'atrazine influence la capacité du transport photosynthétique des électrons. À saturation, l'activité photosynthétique est reliée à la quantité présente de certains transporteurs d'électrons (PQ et cyt f) entre le PS II et le PS I ou à une augmentation du taux de diffusion latérale de ces transporteurs mobiles d'électrons (KYLE & ZALIK, 1982; HUNER, 1984, MANNAN & BOSE, 1985). Le traitement à l'atrazine, en augmentant la proportion d'acides gras insaturés au niveau des thylakoïdes, pourrait augmenter la diffusion des transporteurs mobiles d'électrons entre l'accepteur primaire d'électrons pour le PS II et le cytochrome f. La fluidité des membranes serait déterminante dans la diffusion des plastoquinone (ANDERSON, 1982). Toutefois, selon BARBER & al. (1984), la fluidité des membranes serait plus affectée par une variation dans le rapport "lipides/protéines" que par des changements dans le degré d'insaturation des acides gras. Le traitement à l'atrazine, en favorisant l'élongation du réseau granaire et en diminuant le nombre de thylakoïdes par granum (BEAUMONT & al., 1980, LAROCHE, 1983), pourrait influencer l'accessibilité du DCPIP. En effet, l'accessibilité ou de la diffusion des donneurs ou receveurs d'électrons vers leur site membranaire peut être déterminante dans l'activité photosynthétique (BOSE & al. 1981; JORDAN & al., 1983). L'empilement granaire provoqué par les cations affecte la diffusion du DCPIP, lorsqu'il est utilisé comme donneur d'électrons pour le PS I (RAMANUJAM & BOSE, 1983).

Le traitement des *L. minor* par 0,25 ppm d'atrazine durant leur croissance exige une augmentation de l'intensité lumineuse pour atteindre la demi-saturation de l'activité du photosystème I contrairement au PS II. Ainsi,

le " K_p " subit une hausse importante de l'ordre de 35%, tandis que la vitesse maximum augmente faiblement (observée 6%; calculée 15%). L'atrazine administrée lors de la croissance diminue fortement le pourcentage de chlorophylle totale associée aux complexes pigment-protéine du PS I, soit le CP1a et CP1 (LAROCHE, 1980). Ce changement dans le contenu en chlorophylle associée au PS I, qui pourrait se traduire par une diminution de la taille du PS I, n'est certainement pas étranger à l'augmentation de la valeur du K_p . La baisse de l'activité du PS I en condition d'éclairage limitant pourrait aussi être attribuable à la réorganisation ultrastructurale des membranes (BROADMAN & ANDERSON, 1978). En effet, l'augmentation de la fluorescence observée chez les chloroplastes de plantes traitées suggère un plus grand transfert d'énergie vers le PS II et une diminution vers le PS I.

A saturation, l'étape limitante ne dépend plus du taux d'absorption, mais des réactions d'oxydoréduction qui ont lieu au niveau des chloroplastes, dans les régions du PS I, soit entre la plastoquinone et le site de réaction du méthyl-viologène. Contrairement au DCPIP, l'empilement granaire n'influence pas l'accessibilité du TMPD vers son site de donation probablement imputable à sa taille et à sa solubilité particulière dans les lipides (RAMANUJAM & BOSE, 1983). La faible augmentation de l'activité du photosystème I à saturation par la lumière (V_{max}), indique le peu d'effet du traitement sur les étapes limitantes du transport de l'électron sur cette section de la chaîne. ARMOND & al. (1976) ont observé que les membranes photosynthétiques des chloroplastes de pois, dont la croissance s'est effectuée sous lumière intermittente (cycle de 2 min. de lumière, 98 min. d'obscurité) possédaient, malgré la diminution de leur

taille, des photosystèmes I plus actifs (DCPIP→MV) à saturation lumineuse. Ils attribuèrent ce résultat au fait que l'activité spécifique exprimée sur une base de chlorophylle peut donner des valeurs artificiellement élevées comparativement à l'expression de celles-ci par le nombre d'électrons transportés par centre réactionnel (P-700).

L'atrazine n'affecte pas le transport des électrons le long de la chaîne (réaction de Melher: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$). Les valeurs de " K_p " et de " V_{\max} " calculées à partir des courbes de saturation par la lumière ne diffèrent pas entre les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées. La difficulté d'obtenir des résultats reproductibles lors de ces essais est imputable à l'activité photosynthétique normalement plus faible pour la mesure du transport des électrons le long des deux photosystèmes et de la sensibilité de l'instrument de mesure. Contrairement à la réaction ne faisant intervenir que le photosystème I (TMPD \rightarrow MV), la photooxydation de l'eau par le PS II provoque la libération d'oxygène dans le rapport 1/2 molécule pour chaque molécule d'oxygène consommée lors de la réaction de Mehler (ORT & IZAWA, 1974), ce qui diminue d'autant l'activité photosynthétique. De plus, lors de l'étude du PS I, contrairement à ceux sur la chaîne entière, le parcours des électrons, relativement court, est peu susceptible d'être affecté, puisque les électrons sont donnés par le TMPD près du P700 et acceptés par le MV près de l'accepteur primaire d'électrons.

Lors de la mesure du transport photosynthétique des électrons sur la chaîne entière à des pH variées et en présence ou en l'absence de magnésium,

les chloroplastes de plantes traitées à l'atrazine ont une activité réductrice plus élevée comparativement à ceux des plantes témoins. Cependant, étant donné les variations expérimentales et le faible degré de liberté, ces résultats ne sont pas considérés comme significatifs. En condition d'éclairage limitant, il est possible qu'à force d'expériences, nous puissions confirmer nos résultats en accord avec ceux obtenus *in vivo* par BEAUMONT & al. (1976 b). Dans notre cas, la photosynthèse est mesurée par polarographie en utilisant le MV comme receveur d'électrons, tandis que l'étude de BEAUMONT se réfère au respiromètre de Gilson pour les plantes entières. Malgré tout, l'étude des valeurs de K_p pour chaque type de réaction nous permet de constater que chez les chloroplastes de plantes traitées, l'activité du PS I atteint le point de saturation à des intensités lumineuses inférieures à celles du PS II, contrairement à la situation qui prédomine chez les chloroplastes de plantes témoins. L'étude des pH variés en présence ou l'absence de magnésium sur la chaîne entière de transport de l'électron des chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées indique que, chez les deux groupes, l'activité maximum, en présence ou en l'absence de $MgCl_2$, se situe à pH 7,5. L'activité des photosystèmes est maximum pour les pH compris entre 7,5 et 8,5 (SUN & SAUER, 1971; GOULD & ISAWA, 1973; BOSE & al., 1981). Outre le fait que le $MgCl_2$ peut intervenir dans la distribution de l'énergie d'excitation, il est nécessaire à l'activité photosynthétique du PS I et du PS II. L'ajout de $MgCl_2$ à des suspensions de chloroplastes stimule l'activité photosynthétique du PS II tout en accélérant la réduction des plastoquinones et en augmentant leur diffusion du PS II vers le PS I (TIKHONOV & al., 1984; BOSE & ARTZEN, 1978).

Selon BROADMAN (1977), la classification d'une plante en espèces d'ombre, intermédiaire ou de soleil ne peut être basée sur les courbes de saturation lumineuse. Le degré d'empilement granaire varie habituellement selon le rapport Chl a/b (BROADMAN & ANDERSON, 1978; ARO & al., 1986). Il existe cependant de nombreux exemples où l'empilement granaire ne peut être relié au contenu des membranes en Chl a et b. Les plantes dont la croissance s'effectue sous plusieurs qualités spectrales d'éclairage ne présentent pas de différences significatives dans le rapport Chl a/b, mais affichent des changements ultrastructuraux importants des chloroplastes, ainsi qu'une nouvelle répartition de la teneur en chlorophylle totale associée à chaque photosystème (LEONG & al., 1984). Par ailleurs, les chloroplastes de *L. minor* traitées à l'atrazine présentent aussi des caractéristiques très communes avec le traitement de cotylédons de radis à doses de 10^{-4} M de benzon lors de la croissance et à de fortes intensités lumineuses (LICHTENTHALER & al., 1982; LAROCHE, 1983). Par l'augmentation du rapport membranes accolées/non accolées et la diminution de la quantité de chlorophylle totale associée au CP I et au CPIa. Les chloroplastes de radis dont les cotylédons ont été traités au benzon présentent une augmentation du rapport membranes accolées/non accolées et sont associés à des modifications similaires à celles des plantes d'ombre. De plus, il semble y avoir une relation entre les plastes des plantes qui se sont développés sous une lumière enrichie en bleu et celles dont la croissance a eu lieu sous une intensité lumineuse élevée (BUSCHMANN & al., 1978; LEONG & al., 1985). Puisque les herbicides particuliers au PS II suscitent une réponse de type d'ombre (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 1978; ANDERSON, 1982), nous croyons que l'étude de l'influence de l'atrazine lors la croissance de plantes à de faibles intensités lumineuses serait complémentaire à l'étude à

de fortes intensités lumineuses et selon diverses qualités spectrales de l'éclairement. En effet, elle permettrait de mieux distinguer la réponse des plantes à l'atrazine, ainsi que celle des plantes aux variations de l'intensité lumineuse lors de la croissance.

Nous avons vérifié l'efficacité de l'atrazine à inhiber le transport des électrons *in vitro* chez les suspensions de chloroplastes de *Lemna minor* témoins ou traitées à l'atrazine. Pour ce faire, nous avons déterminé la concentration d'herbicide pour laquelle l'activité photosynthétique est inhibée de 50% (I_{50}). La valeur du I_{50} est habituellement considérée comme l'indice du nombre de centres réactionnels du PS II présents (MANNAN & BOSE, 1985). Malgré un I_{50} deux fois plus élevé chez les membranes de chloroplastes de plantes traitées ($I_{50}=0,64 \pm 0,24 \mu\text{M}$) par rapport à celle des chloroplastes de plantes témoins ($I_{50}=0,35 \pm 0,13 \mu\text{M}$), les deux groupes semblent présenter la même sensibilité à l'atrazine, puisque les intervalles de confiance à 95 % des moyennes se recoupent. Les concentrations d'atrazine causant une diminution de 50% de l'activité photosynthétique du PS II ($\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{DCPIP}$) chez les chloroplastes de *Lemna minor* témoins sont du même ordre de grandeur que *Pisum sativum* (le pois: $I_{50}=0,25 \mu\text{M}$; PFISTER & al., 1981) ou *Brassica campestris* (le radis: $I_{50}=0,18 \mu\text{M}$; DARR & al., 1981). Cependant, ces valeurs sont de beaucoup inférieures à celles des plantes considérées comme résistantes à l'atrazine où les valeurs de I_{50} peuvent atteindre 100 μM pour *Brassica campestris* (DARR & al., 1981). L'augmentation de la valeur de I_{50}

par suite du traitement pourrait provenir d'une variation de l'environnement lipidique dans la région du site de fixation de l'atrazine et serait susceptible d'influencer son accessibilité. Cette hypothèse semble appuyée davantage par le rapport Chl a/b identique chez les chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées à l'atrazine plutôt que par une modification du nombre de centres réactionnels présents (MANNAN & BOSE, 1985). Toutefois, il serait nécessaire de déterminer par une méthode directe le nombre de centres réactionnels présents pour chaque photosystème. En effet, selon MANNAN & BOSE (1985), un changement dans le nombre de centres réactionnels serait accompagné d'une variation dans le rapport chl a/b et un changement à ce niveau pourrait aussi contribuer à rendre compte de l'activité photosynthétique du PS II plus élevée à saturation lumineuse. Le traitement à l'atrazine affecterait davantage la fixation du DCMU dont le site se situe à proximité de l'atrazine au niveau de la protéine Q_B (MATTOO & al., 1984 b). Il existe maintenant plusieurs preuves expérimentales qui montrent que l'atrazine bloque le transport de l'électron en se liant à une protéine de 32 Kd, la protéine Q_B (PFISTERS & ARNTZEN, 1979; KYLE, 1985). La dégradation de cette protéine serait retardée chez les plantes dont la croissance s'effectue en présence d'atrazine (MATTOO & al., 1984 a, 1984 b). Soumise à un taux de renouvellement rapide et proportionnelle à l'intensité lumineuse (MARDER & al., 1984), sa dégradation, sous une forte intensité lumineuse, a été reliée au processus de photoinhibition retrouvé chez les plantes (ARNTZEN & al., 1984). MATTOO & al. (1984 b) suggèrent que la 32 Kd pourrait être associée à un mécanisme compensatoire qui maintiendrait une interaction fonctionnelle entre les protéines régulatrices, comme la protéine Q_B et les lipides du PS II. Nos

travaux appuient cette hypothèse, puisque l'atrazine, puissant inhibiteur de la réaction de Hill, administrée lors de la croissance, augmente l'activité photosynthétique des chloroplastes de *Lemna minor* traitées, tout en ralentissant le processus de vieillissement des membranes *in vitro* (Annexe 12) et selon les observations de SIMARD (1985) sur la sénescence des plastes *in vivo*. Les résultats de cette étude montrent qu'une dose sublétaie d'atrazine a pour effet d'accroître le degré d'organisation et la stabilité du réseau membranaire des chloroplastes selon un processus rapide et réversible.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

L'atrazine administrée à doses sublétales lors de la croissance de la *Lemma minor* favorise grandement l'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 680 nm, comme le suggéraient nos travaux antérieurs sur l'ultrastructure des chloroplastes. Toutefois, nos résultats en présence ou en l'absence de cations suggèrent que les changements observés dans la composition lipidique des thylakoïdes et sur le contenu en chlorophylle associé aux sous-unités photosynthétiques pourraient contribuer de façon substantielle à l'augmentation de la fluorescence chez les chloroplastes de plantes traitées. Selon ces résultats, l'augmentation de l'activité photosynthétique du PS II et la diminution du rendement photosynthétique du PS I en condition d'éclairage limitant pourrait être attribuable soit à une distribution de l'énergie lumineuse favorisant le photosystème II, soit à des variations dans la taille des photosystèmes. En fait, ces deux sources possibles de variations non mutuellement exclusives présentent des caractéristiques similaires compte tenu des techniques d'analyse que nous avons utilisées.

Pour faire suite à cette étude, l'emploi de méthodes directes d'évaluation de la taille des photosystèmes et du nombre de centres réactionnels présents permettront d'acquérir des informations supplémentaires essentielles à la compréhension des variations induites par l'atrazine sur le

rendement photosynthétique. De plus, la quantification de certains transporteurs d'électrons, comme le cytochrome f et les plastoquinones devront compléter des travaux ultérieurs sur le transport photosynthétique des électrons. Finalement, grâce à l'étude aux basses températures et à la cinétique de la fluorescence, nous pourrons étudier l'émission des centres réactionnels et des antennes collectrices de lumière. Ces connaissances permettront de distinguer avec plus de précision les répercussions possibles du traitement à l'atrazine sur la distribution de l'énergie et sur le transport photosynthétique des électrons.

ANNEXES

Annexe 1: Influence de la concentration de magnésium (MgCl_2) sur l'émission de la fluorescence à 680 nm par les chloroplastes de l'épinard.

Les chloroplastes non enrichis (non lavés) sont extraits à même 40 g de feuilles d'épinard homogénéisées dans le tampon Na-tricine à 30 mM, à pH 7,8 à et 5 °C en présence de 0,4 M de sucrose et de 20 mM de NaCl. L'homogénat filtré sur coton fromage est donc centrifugé à 1500 x g pendant une période de 5 minutes. Le culot est resuspendu dans le tampon Na-tricine à 30 mM et à pH 7,4 en présence de 20 mM de NaCl pour une concentration en chlorophylle de 125 µg/ml. L'enrichissement consiste donc à reprendre, après la première centrifugation, les chloroplastes dans le tampon Na-tricine à 30 mM et à pH 7,4 en présence de 20 mM de NaCl, puis de centrifuger une seconde fois à 1500 x g. Lors des lectures de la fluorescence à 21 °C, le milieu d'essai se compose du tampon Na-tricine à 30 mM et à pH 7,4 en présence de 20 mM de NaCl. La concentration finale en chlorophylle est de 5µg/ml (JENNINGS & al., 1978).

Le magnésium (MgCl_2) exerce une grande influence sur l'émission de la fluorescence à 680 nm de chloroplastes d'épinard enrichis ou non (FIG. A1 1.1). La fluorescence émise par les chloroplastes non enrichis s'accroît fortement (≈80%) de 0 à 3 mM de MgCl_2 pour s'atténuer vers 4 mM. Les chloroplastes enrichis semblent se distinguer de leurs homologues non enrichis par une baisse de la fluorescence de 0 à 0,1 mM de MgCl_2 (≈9%) et par le seuil maximal d'émission situé à 2 mM de MgCl_2 . Les concentrations de l'ordre de 1,5 mM de MgCl_2 nous permettent d'obtenir une fluorescence maximum et se comparent à

celles requises lors d'autres travaux sur l'épinard (SEARLE & al., 1977) et sur le pois (LIEBERMAN & al., 1978). Cette étude nous aura donc permis de nous familiariser avec la procédure courante.

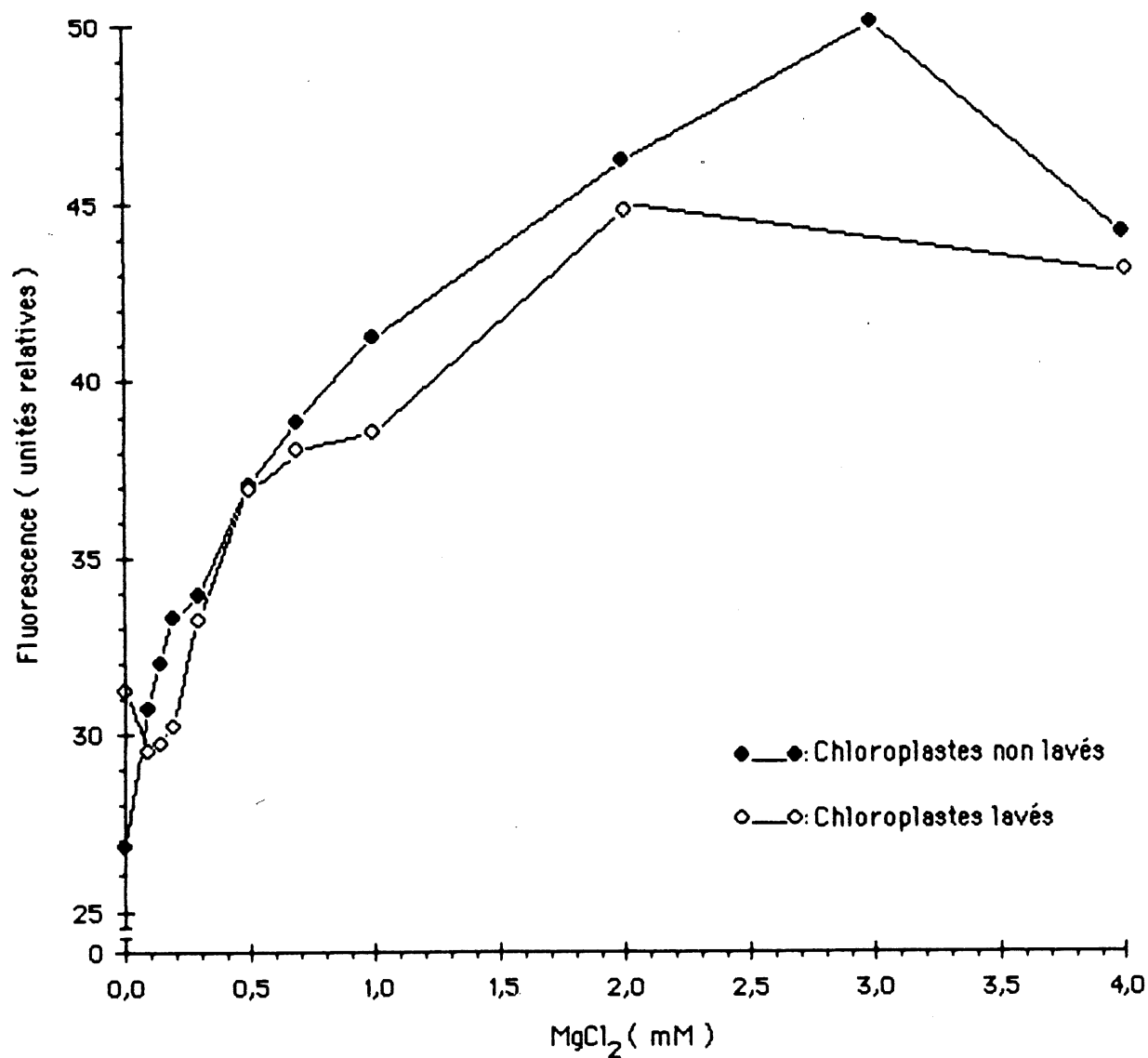


FIG. A 1.1: Influence de la concentration en chlorure de magnésium sur l'émission de la fluorescence par les chloroplastes lavés et non lavés de l'épinard.

Annexe 2: Influence de la concentration de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et de chlorure de potassium (KCl) sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine et isolés sur coussin de Percoll en présence ou en l'absence de sorbitol, NaCl et EDTA.

Les chloroplastes de *L. minor* témoins et *L. minor* traitées sont extraits selon la méthode de purification de LAROCHE (1983), jusqu'au coussin de Percoll inclusivement. À partir de cette étape, nous avons procédé à l'éclatement des enveloppes en reprenant les culots des chloroplastes intacts des plantes témoins et des plantes traitées dans le tampon Na-tricine à 30 mM et à pH 7,4 en présence de 5 mM de NaCl. Les suspensions sont alors centrifugées à $5000 \times g$ pendant 3 minutes. Les culots sont repris dans le même tampon (2 à 3 ml) de façon à obtenir une quantité de chlorophylle équivalente à 125 $\mu g/ml$. Lors des lectures de la fluorescence, 0,1 ml d'une suspension est ajouté à 2,4 ml de tampon de resuspension en présence de concentrations variées (entre 0 et 4 mM) de $MgCl_2$ ou de KCl pour une concentration finale en chlorophylle de 5 $\mu g/ml$.

Selon les résultats de quatre expériences (figure A 2.1 à A 2.4), nous observons que des concentrations de magnésium variant de 0,2 mM jusqu'à un maximum de 1 mM provoquent des augmentations d'intensité de la fluorescence de l'ordre de 25 à 50% par rapport à ce que nous observons en l'absence de $MgCl_2$. Le seuil maximum d'émission est atteint à 1 mM de $MgCl_2$. L'écart de la fluorescence émise entre les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées est variable. Hormis la valeur maximum d'intensité de la fluorescence, qui varie considérablement d'une expérience à l'autre, la présence

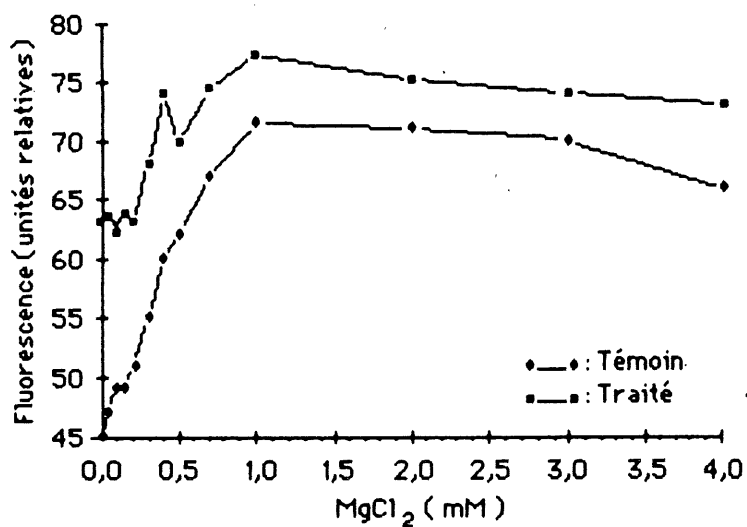


FIG. A 2.1: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

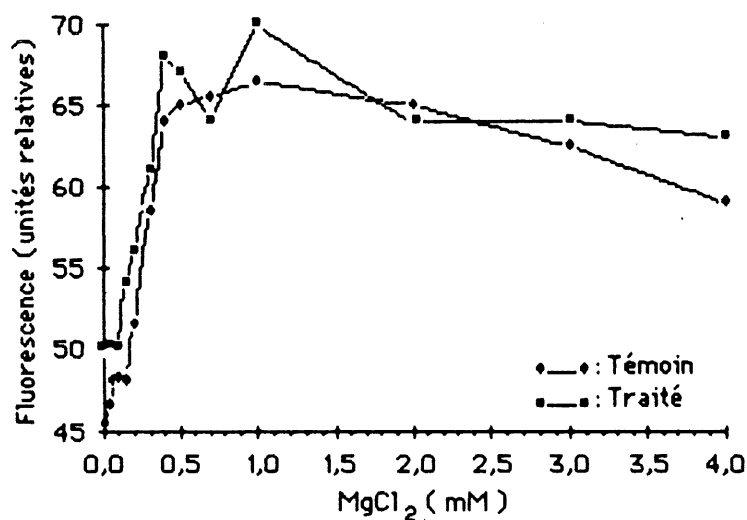


FIG. A 2.2: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

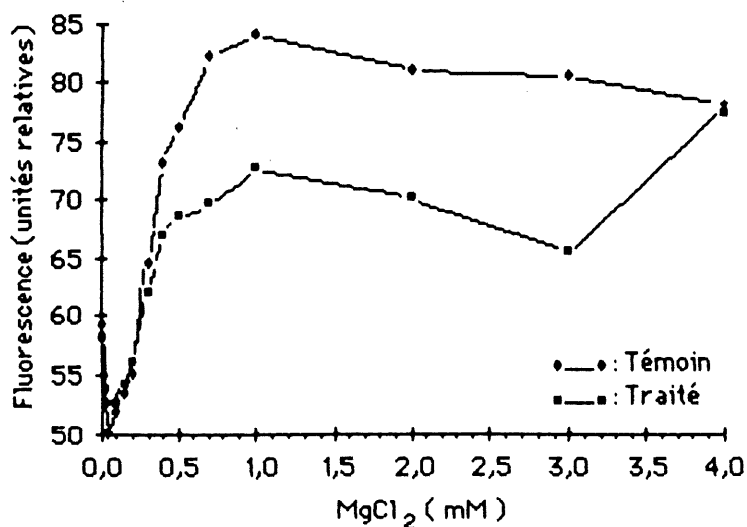


FIG. A 2.3: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

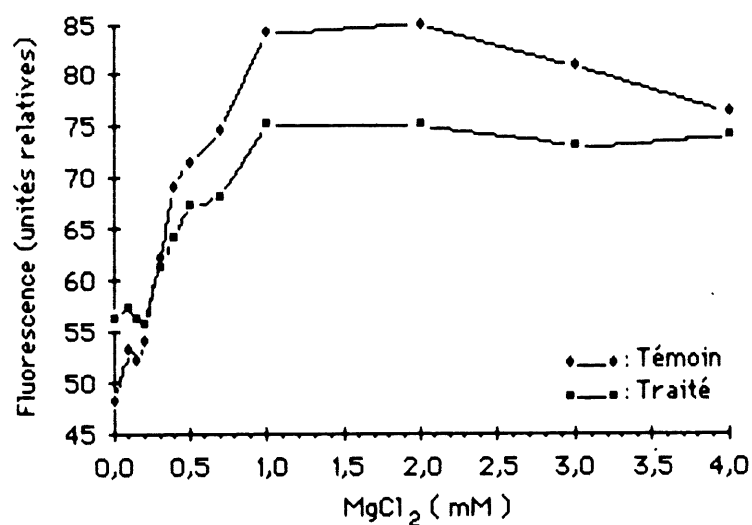


FIG. A 2.4: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

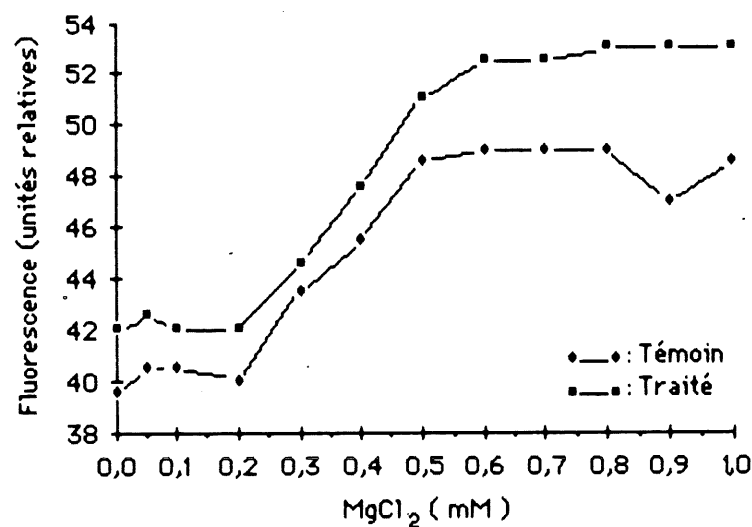


FIG. A 2.5: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine extraits en l'absence de NaCl.

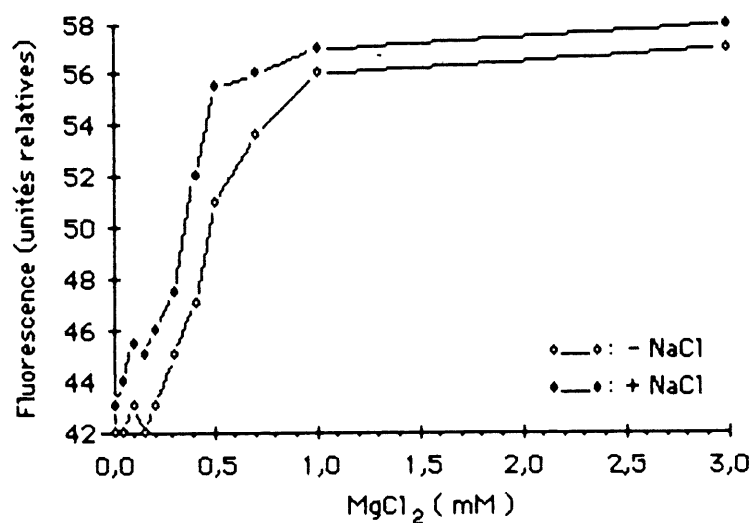


FIG. A 2.6: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins extraits en présence ou en l'absence de 5 mM de NaCl.

de NaCl dans les tampons d'extraction ou d'essai ne semble pas avoir d'effet sur l'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 680 nm. (figure A 2.5 et A 2.6), puisque les écarts entre les courbes en présence ou en l'absence de NaCl sont très similaires. Cependant, en l'absence de NaCl (figure A 2.6), le seuil minimum de la fluorescence se situe entre 0 et 0,2 mM de $MgCl_2$. Pour l'ensemble des expériences, on assiste à une légère diminution de la fluorescence vers les concentrations de chlorure de magnésium supérieures à 1 mM. L'intensité maximum de la fluorescence est atteinte vers 40 mM de KCl, ce qui représente des concentrations plusieurs fois supérieures à celles obtenues avec le magnésium (figure A 2.7). La présence de EDTA, lors de l'extraction, au moment du choc osmotique (figure A 2.7), amène une diminution importante de la fluorescence obtenue en présence de KCl. Par ailleurs, la présence de 0,1 M de sorbitol dans le tampon de conservation des chloroplastes paraît augmenter l'effet du $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence (figure A 2.8 et A 2.9).

Nous avons fait subir un choc osmotique aux chloroplastes après la centrifugation sur coussin de Percoll à cause de l'imperméabilité de l'enveloppe aux cations (GIMMLER, 1975), bien que celle-ci ne soit pas totalement imperméable aux cations (DESHAIES, 1984). Pour tenter d'éliminer une certaine variabilité des résultats, nous avons étudié l'influence du NaCl et l'emploi de EDTA, lors de l'extraction de chloroplastes, sur l'intensité de la fluorescence en présence de cations. Puisque le tampon utilisé contient déjà une certaine quantité de cations provenant du chlorure de sodium, il est donc normal de ne pas obtenir d'effet en l'absence de NaCl lors de l'extraction. L'emploi de EDTA comme agent chélateur cause une baisse importante de la fluorescence émise.

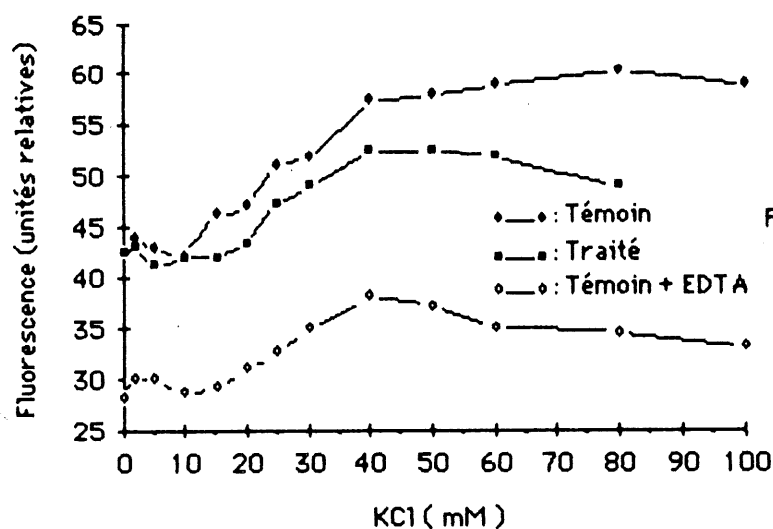


FIG. A 2.7: Influence de concentrations variées de KCl sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine et effet de l'utilisation de EDTA lors de l'extraction.

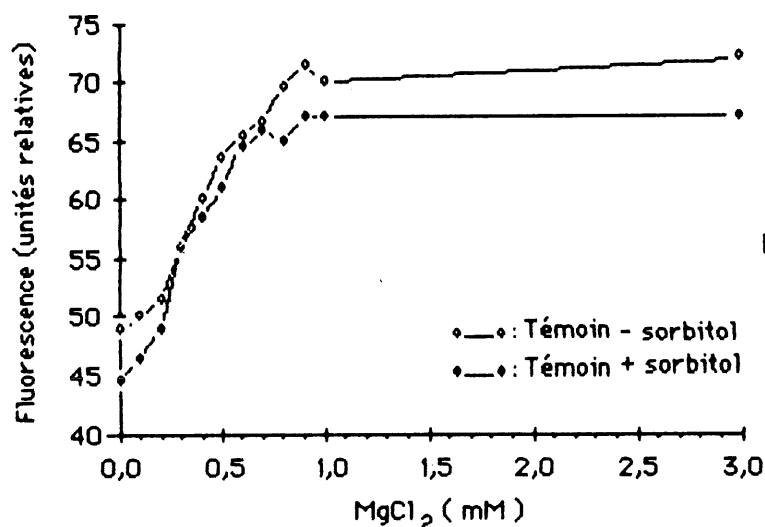


FIG. A 2.8: Influence de concentrations variées de MgCl₂ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins conservés en présence ou en l'absence de 0,1 M sorbitol.

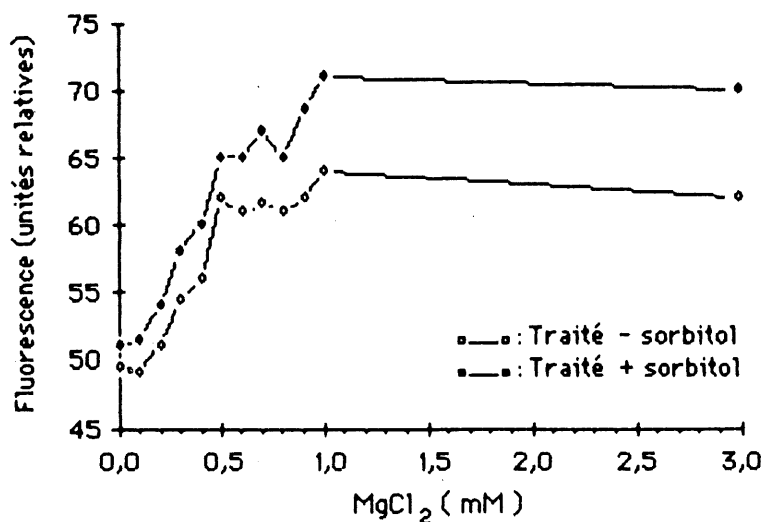


FIG. A 2.9: Influence de concentrations variées de MgCl₂ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* traitées conservés en présence ou en l'absence de 0,1 M sorbitol.

Selon DUVAL (1974), une centrifugation des chloroplastes en présence de EDTA à 3 mM peut amener une perte importante de cations et jusqu'à 25% des protéines faiblement liées aux membranes. Ce sont, entre autres, la RUDP-carboxylase, la Mg-ATPase et Ca-ATPase. En outre, la perte de protéine sous l'effet de EDTA pourrait aussi provoquer un réarrangement et une réorientation des complexes pigments-protéines. Ces changements sont également susceptibles d'influencer la fluorescence. L'emploi de sorbitol dans le milieu de conservation des chloroplastes peut aider à préserver l'intégrité des membranes thylakoïdiennes en diminuant notamment la perte d'acides gras libres (PAPAGEORGIU, 1980), tout en ralentissant le processus de dénaturation des protéines (LEE & TIMASHEFF, 1981).

Annexe 3: Influence de concentrations variées de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées. Effet du tampon Tris-HCl, du tampon Na-tricine et du coussin de Percoll, ainsi que du sucrose.

Les chloroplastes sont extraits selon la procédure décrite au chapitre 2. Selon le cas, le tampon Na-tricine à 50 mM et à pH 7,5 peut remplacer le tampon d'homogénéisation Tris-HCl à 50 mM et à pH 7,5. L'étape de centrifugation des extraits sur coussin de Percoll a lieu avant le choc osmotique, c. à d. avant l'éclatement des chloroplastes, selon la procédure décrite par LAROCHE (1983). Les extraits sont conservés en présence ou en l'absence de 0,1 M de sucrose dans le Na-tricine à 25 mM et à pH 6,5 dans un volume réduit (0,7 et 1,7 ml; voir METHODOLOGIE, p. 12).

L'influence du magnésium sur l'émission de la fluorescence à 680 nm d'une suspension de chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées et homogénéisées dans le tampon Na-tricine à 50 mM et à pH 7,5 est illustrée aux figures A 3.1 (conservation en l'absence de sucrose) et A 3.2 (conservation en présence de sucrose à 0,1 M). La fluorescence augmente avec l'élévation de la concentration de magnésium dans le milieu jusqu'à un seuil maximum d'environ 1 mM. L'amplitude de la stimulation de la fluorescence par le magnésium est plus prononcée chez les chloroplastes de plantes témoins comparativement à ceux des plantes traitées ($\approx 35\%$ contre 15%). En fait, lorsqu'on utilise le tampon Na-tricine lors de l'homogénéisation, on note une augmentation moindre de l'intensité de la fluorescence en présence de $MgCl_2$. De plus, il semble avantageux d'utiliser le Tris-HCl lors de l'homogénéisation des plantes

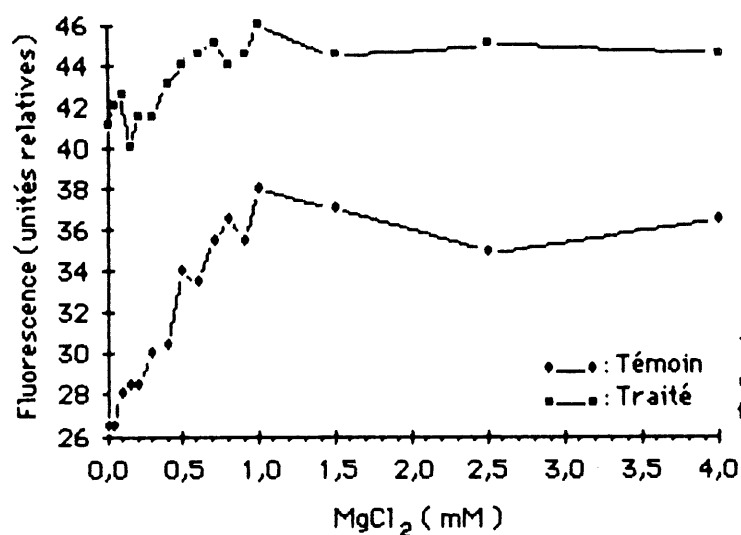


FIG. A 3.1: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

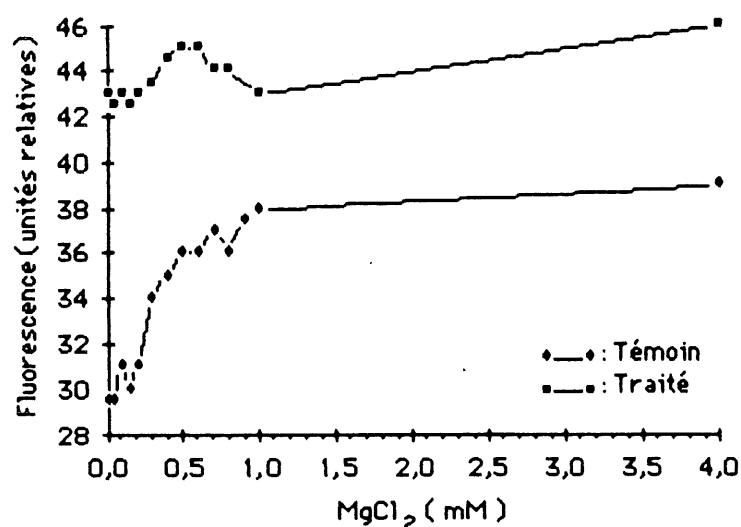


FIG. A 3.2: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine conservés en présence de 0,1 M sucrose.

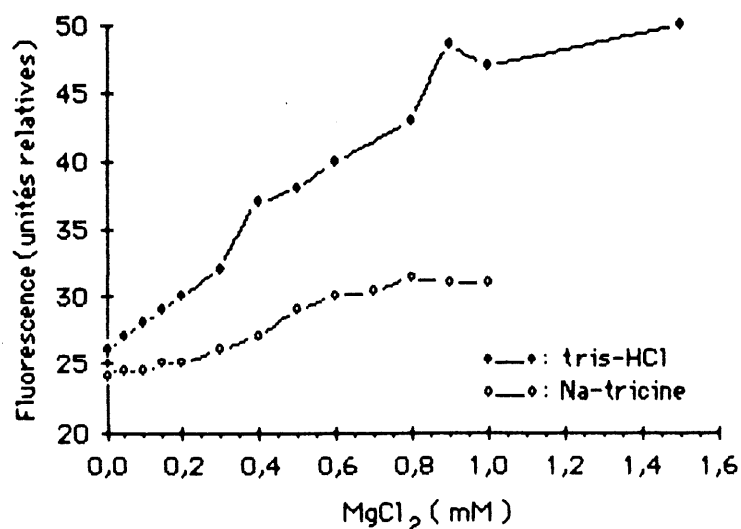


FIG. A 3.3: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins homogénéisés dans le tampon tris-HCl à 50 mM à pH 7,5 ou Na-tricine à 50 mM à pH 7,4 conservés dans le tampon Na-tricine à 25 mM à pH 7,5 en présence de 0,1 M sucrose.

témoins (figure A 3.3). De même, à des concentrations inférieures à 1 mM de chlorure de magnésium, l'homogénéisation des plantes semble plus appropriée. dans le tampon Tris-HCl (tableau A 3.1), puisque l'augmentation de la fluorescence obtenue avec le $MgCl_2$ est plus élevée que lors de l'extraction par le coussin de Percoll ou le Na-tricine. De plus, la centrifugation sur coussin de Percoll semble diminuer l'augmentation de la fluorescence davantage chez les plantes traitées que chez les plantes témoins.

TABLEAU A 3.1: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine et extraits dans le tampon Tris-HCl à 50 mM et à pH 7,5 (avec ou sans coussin de Percoll) ou dans le tampon Na-tricine à 50 mM et à pH 7,5.

Fluorescence (unités relatives)						
$MgCl_2$ (mM)	Tris-HCl		Tri-HCl + Percoll		Tricine	
	Témoin	Traité	Témoin	Traité	Témoin	Traité
0,00	18,0	25,5	17,0	22,0	16,0	25,0
0,10	19,0	27,0	-	-	-	-
0,15	19,9	27,0	-	-	-	-
0,20	19,5	31,5	-	-	-	-
0,30	21,0	35,5	21,0	27,0	17,0	27,0
0,40	22,5	37,0	-	-	-	-
0,50	23,0	37,0	25,5	31,0	18,5	30,0
0,60	24,0	40,0	-	-	-	-
0,70	25,0	41,0	28,0	32,5	21,5	31,0
0,80	27,5	41,5	-	-	-	-
0,90	28,5	41,5	-	-	-	-
1,00	28,5	38,0	31,5	34,0	25,0	34,0
2,00	29,5	39,5	34,0	35,5	26,5	37,0

Annexe 4: Influence de concentrations variées de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine; influence de l'osmolarité du milieu de conservation des chloroplastes et du milieu d'essai lors des lectures de la fluorescence.

Les chloroplastes sont extraits selon la procédure décrite en 2.2. Selon l'expérience effectuée, les chloroplastes de plantes témoins sont conservés, après l'éclatement, en présence de sucrose à 0,1 ou 0,3 M. tandis que ceux des plantes traitées le sont dans le sucrose à 0,1 ou 0,7 M.

Les concentrations élevées de sucrose utilisées pour la conservation des chloroplastes ne semblent pas avoir d'effet particulier sur l'émission de la fluorescence des suspensions en présence ou en l'absence de 1 mM de chlorure de magnésium (TABLEAU A 4.1). Toutefois, les concentrations élevées de sucrose dans le milieu de suspension des chloroplastes utilisées lors des lectures diminuent fortement l'amplitude de la stimulation de la fluorescence par le magnésium. La présence de sucrose à 0,1 M dans le milieu d'essai semble accentuer l'effet du magnésium sur l'émission de la fluorescence. La resuspension des chloroplastes après l'extraction en présence de 0,1 M de sucrose est une procédure couramment utilisée pour de nombreuses espèces végétales (CHOW & BARBER, 1980; HOPKINS, 1980). De même, après l'éclatement des enveloppes par suite du choc osmotique, le rétablissement des concentrations de sucrose qui assuraient l'intégrité du chloroplastes est une autre méthode qui peut être utilisée (GROUZIS & al., 1982).

TABLEAU A 4.1: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine et effet de l'osmolarité du milieu de conservation des chloroplastes et du d'essai de la fluorescence.

		Fluorescence (unités relatives)			
Tampon de conservation sucrose (M)		0,1	0,3	0,1	0,7
Tampon d'essai		Témoin		Traité	
$MgCl_2$ (mM)	Sucrose (M)				
0,0	0,0	29,0	29,5	48,0	49,0
1,0	0,0	36,0	37,0	55,5	54,0
0,0	0,1	25,0	27,5	43,0	43,0
1,0	0,1	35,0	36,0	57,0	54,0
0,0	0,3	28,0	27,0	46,0	44,0
1,0	0,3	34,0	36,0	57,0	54,0
0,0	0,7	26,0	28,0	46,0	44,0
1,0	0,7	31,0	31,0	50,0	47,5
0,0	1,0	27,0	27,0	47,0	44,0
1,0	1,0	28,0	29,0	52,0	50,0

Tampon de conservation: Na-tricine 25 mM pH 6,5; Tampon d'essai: Na-tricine 25 mM pH 7,5

Annexe 5: Influence de concentrations variées de Na-tricine à pH 8 sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine.

Les chloroplastes sont extraits selon la procédure décrite au chapitre 2. Toutefois, les culots de chloroplastes sont suspendus et conservés dans le tampon Na-tricine à 1 mM et à pH 6,5. De plus, pour les mesures de l'émission de la fluorescence à 680 nm en présence de concentrations variées (0 à 25 mM) de Na-tricine à pH 8, la quantité de NaCl retrouvée doit être la même pour chaque solution. Pour y parvenir, il s'agit d'effectuer les dilutions à partir d'eau distillée à pH 8 contenant la même quantité de NaCl que de NaOH retrouvé dans la solution-mère du tampon Na-tricine à 25 mM.

La présence du tampon Na-tricine provoque une réduction de l'intensité de la fluorescence à 680 nm par les suspensions de chloroplastes de plantes témoins et de plantes traitées par rapport à l'intensité maximum de la fluorescence. De 0 à 25 mM de tampon Na-tricine, la diminution de la fluorescence est de l'ordre de 50% chez les plantes témoins et les plantes traitées. Les chloroplastes de *L. minor* traitées émettent davantage de fluorescence que ceux des *L. minor* témoins pour toutes les concentrations de tampon. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par GROSS & HESS (1973). En fait, lors de l'étude de la fluorescence en présence de cations ou de l'empilement granaire, le tampon Na-tricine est régulièrement utilisé pour provoquer la séparation des membranes thylakoïdiennes accolées.

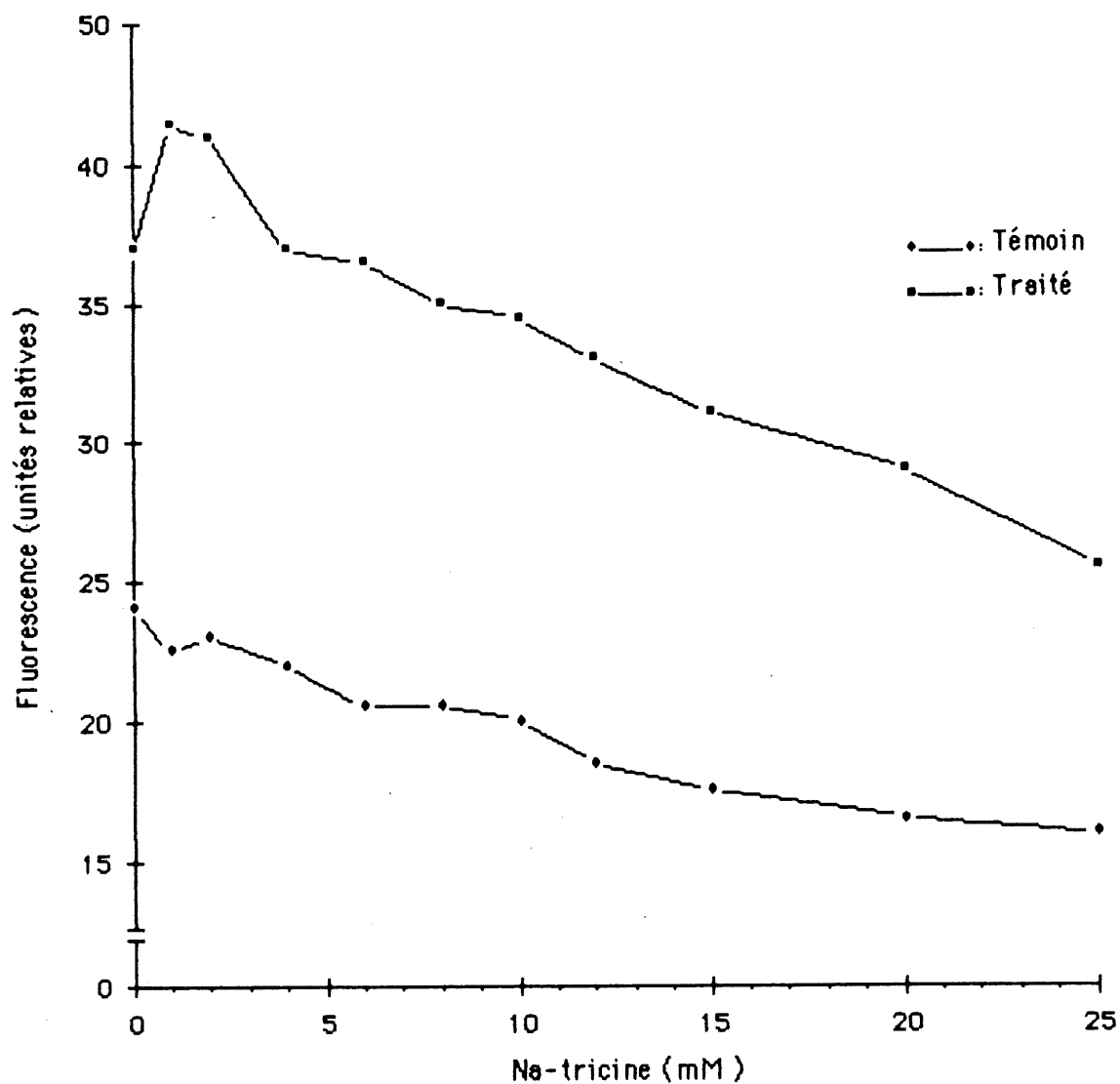


FIG. A 5.1: Influence de concentrations variées de Na-tricine sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine.

Annexe 6: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ et du pH sur l'émission de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine excités à 440 et à 470 nm.

Les chloroplastes sont extraits selon la procédure décrite au chapitre 2. L'effet du magnésium sur l'intensité de la fluorescence des chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées à l'atrazine en suspension dans le tampon Na-tricine à 25 mM et à pH 7 ou pH 8 est illustré à la figure A 6.1. Pour toutes les concentrations de magnésium étudiées, l'intensité de la fluorescence émise par les plantes traitées est toujours supérieure à celle des plantes témoins. L'abaissement du pH à 7 ou l'augmentation du pH à 8 semble réduire considérablement la quantité de chlorure de magnésium nécessaire pour provoquer l'émission maximum de la fluorescence. A pH 7, le seuil maximum est atteint pour des concentrations d'environ 2 mM de $MgCl_2$ pour les deux groupes, tandis qu'à pH 8 il se situe à 0,4 mM (témoins) et 0,2 mM (traitées). L'excitation des suspensions à 470 au lieu de 440 nm cause une augmentation de la fluorescence émise. Le seuil maximum de la fluorescence atteint à 0,2 mM de magnésium (traitées) et à 4 mM (témoins), à pH 8, a été étudié plus en détails à la figure A 6.2 pour tenter de confirmer cette différence. Une série de trois expériences indique qu'en fait le seuil maximum se situe vers 0,8 mM de magnésium (traitées) et 0,9 mM (témoins), ce qui est comparable aux résultats obtenus à pH 7,5 (voir figure 8). La question de l'effet du magnésium et du pH sur l'intensité de la fluorescence est abordée dans la discussion.

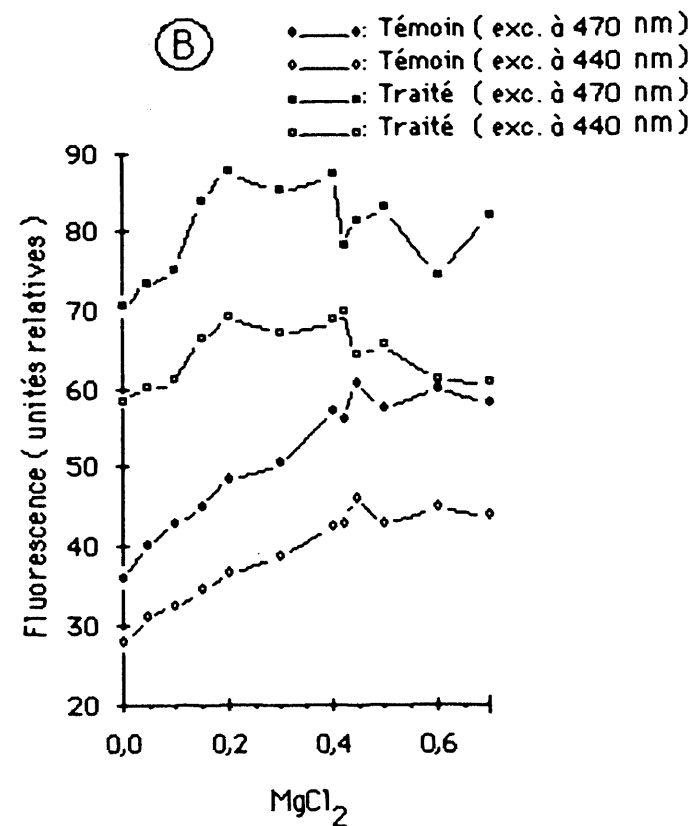
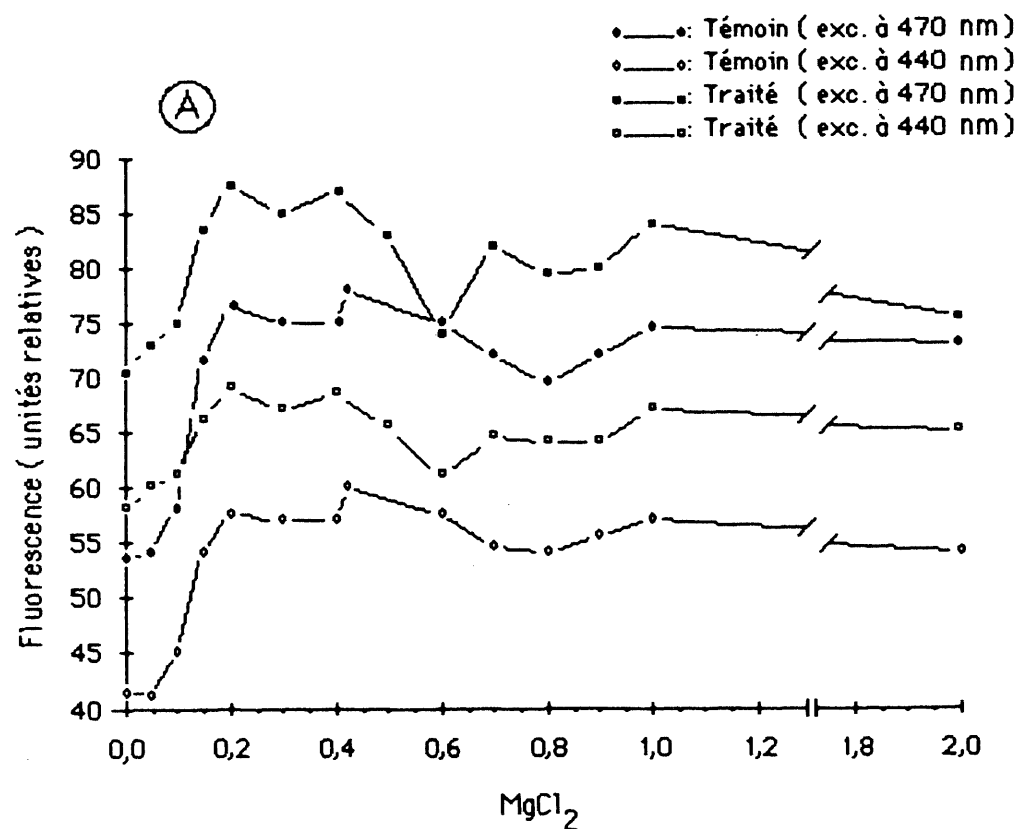


FIG. A 6.1: Influence de concentrations variées de $MgCl_2$ sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine et excités aux longueurs d'onde de 440 et 470 nm à pH 7 (A) et pH 8 (B).

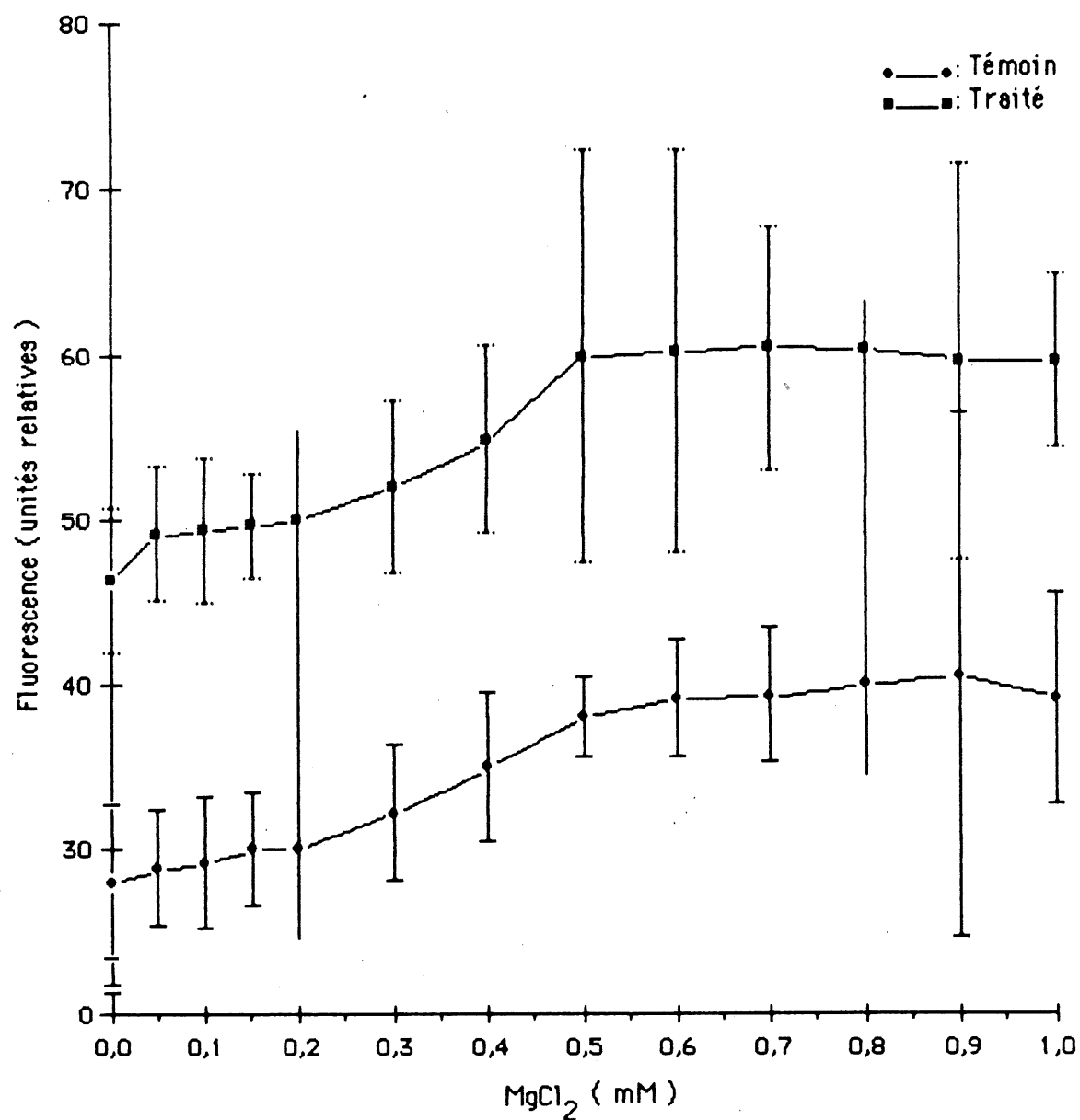


FIG. A 6.2: Influence de concentrations variées de MgCl_2 sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine (pH 8).

Valeur moyenne de 3 répétitions par point avec intervalles de confiance à 95 % des moyennes.

Annexe 7: Mesure par spectrophotométrie en continu du transport photosynthétique des électrons au niveau du PS II; montage expérimental.

Le montage expérimental pour l'étude de l'activité photosynthétique du PS II est illustré à la figure A 7.1 Le spectrophotomètre "Pye unicam SP800" a été légèrement modifié pour permettre l'introduction d'une fibre optique qui servira à illuminer une suspension de chloroplastes lors de la mesure de la réduction du DCPIP à 590 nm. La fibre optique est dirigée vers un filtre rouge (Corning CS-2-64 "Sharp cut 620") au niveau du support à cuvette du spectrophotomètre. Un filtre bleu protège le phototube des radiations rouges diffusées. La source lumineuse provient d'une lampe Sylvania (EKE, halogène) de 150 W et l'intensité est ajustée grâce à un photomètre Li-cor modèle Li-185-B. L'intensité lumineuse est mesurée après le passage dans le filtre rouge et la réduction du DCPIP est lue de manière continue.

Le calcul du taux de réduction du DCPIP exprimé en $\mu\text{moles/mg chl/h}$ est déterminé à partir de la pente selon la formule suivante (HOPKINS, 1980):

$$\Delta \text{ D.O./min.} \times 1/16 \mu\text{moles/ml} \times \text{volume de la réaction (ml)/h} \times 60 \text{ min.} \times 1/\text{mg chl}$$

$$\Delta \text{ D.O./min.} = \text{pente}$$

$$1/16 \mu\text{moles/ml} = \text{Coefficient d'extinction molaire à 590 nm pour le DCPIP.}$$

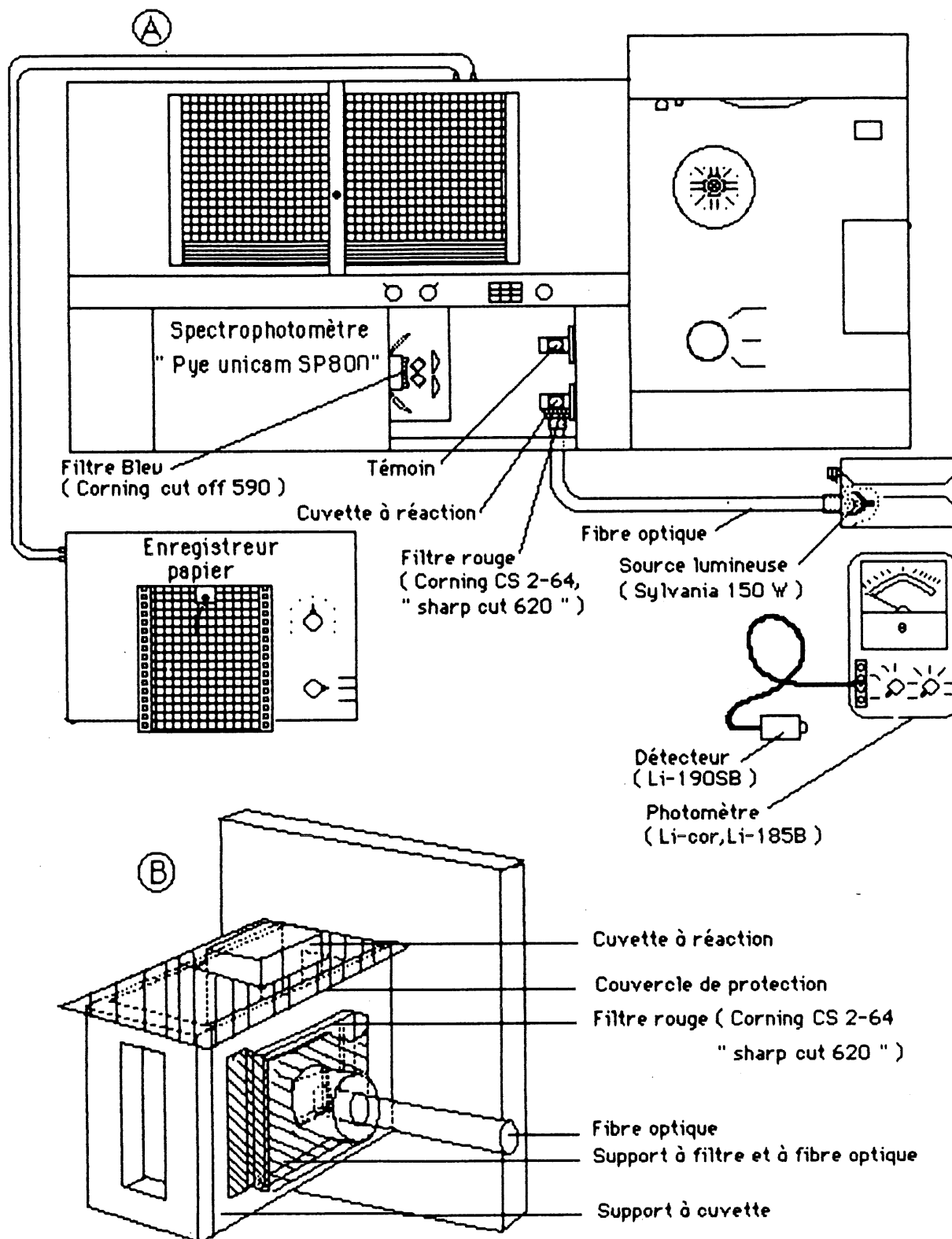


FIG. A 7.1: Illustration du montage expérimental pour les essais sur le tranport photosynthétique des électrons au niveau du PS II (A) et modifications apportées au support à cuvette du spectrophotomètre (B).

Annexe 8: Mesure par polarographie du transport photosynthétique des électrons au niveau du PS I et de la chaîne entière; montage expérimental et plan du circuit électrique de l'oxymètre "YSI 4004".

Le montage expérimental pour l'étude par polarographie du transport photosynthétique des électrons comporte plusieurs éléments (figure A 8.1). Une électrode à oxygène (YSI 4004) qui se compose d'une cathode de platine et d'une anode d'argent dont l'extrémité baigne dans une solution standard de KCl emprisonnée par une membrane de teflon perméable à l'oxygène. L'oxymètre (YSI 4004 préfabriqué) permet d'appliquer un "voltage polarisé" à travers l'électrode. L'oxygène est consommé (réduit) à la cathode et le signal électrique, directement proportionnel au taux de consommation d'oxygène, est amplifié par l'enregistreur-papier. L'oxygène diffuse à l'intérieur de la membrane de teflon à un taux proportionnel à la pression d'oxygène à l'extérieur de celle-ci.

Le plan du circuit électrique de l'oxymètre est représenté à la figure A 8.2. Grâce à la résistance variable "R1", le voltage polarisé est réglé entre 0,65 à 0,8 V. Le zéro de l'enregistreur-papier est réglé à 5 mV et le zéro de l'appareil est ajusté. La calibration (relative) de l'oxymètre a été faite à partir d'une solution saturée en oxygène (100%, R3) et d'une autre saturée en azote (sans oxygène; zéro, R2). Le zéro peut aussi être obtenu en débranchant l'électrode. Puisque à 25 ° C un ml d'eau renferme 250 μ moles d'oxygène, on peut ainsi calculer la quantité relative d'oxygène consommé. La calibration absolue peut se faire selon la méthode décrite par DELIEU & WALKER (1972).

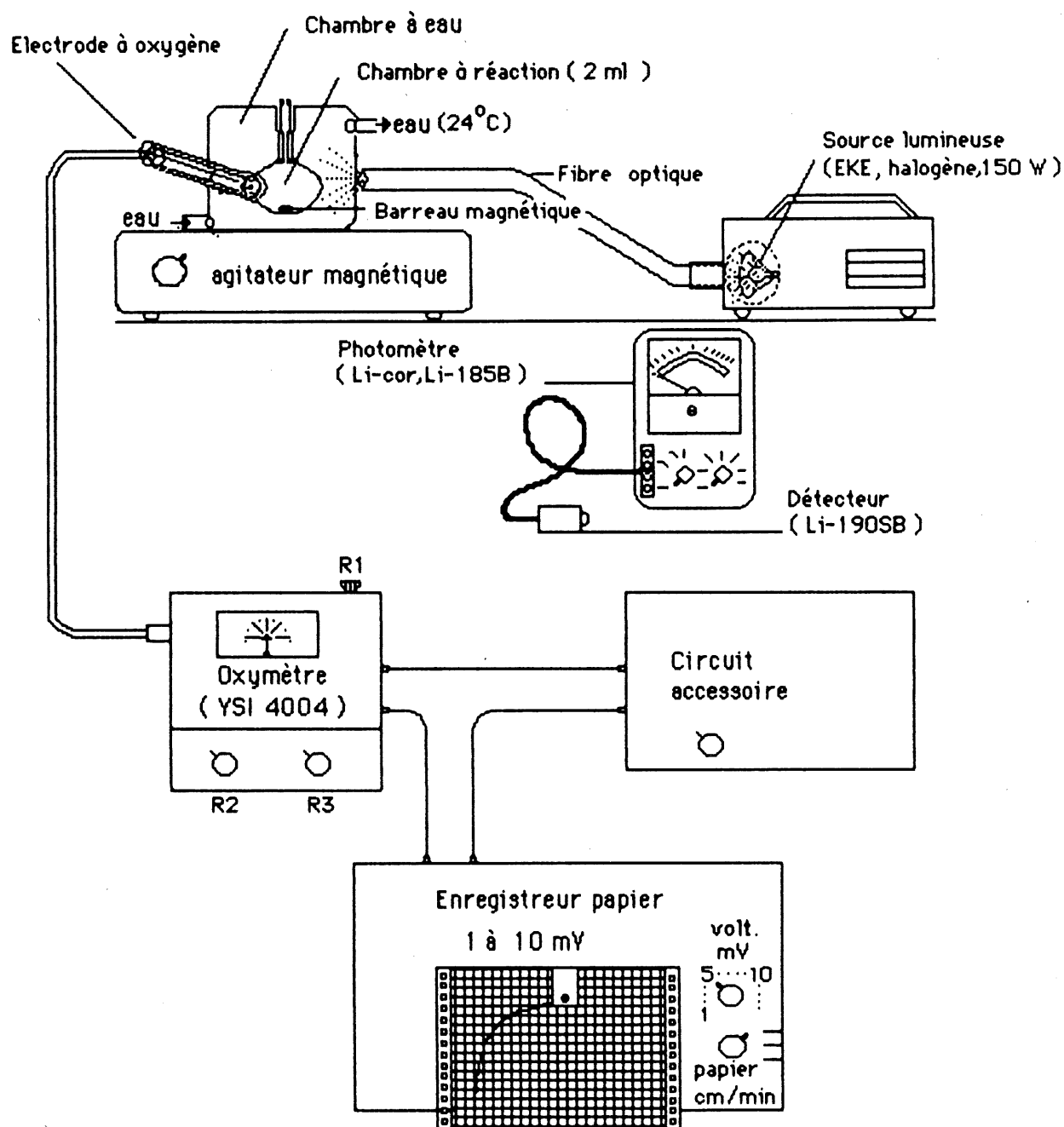


FIG. A 8.1: Illustration du montage expérimental pour les essais sur le transport photosynthétique des électrons pour le PS I et la chaîne entière.

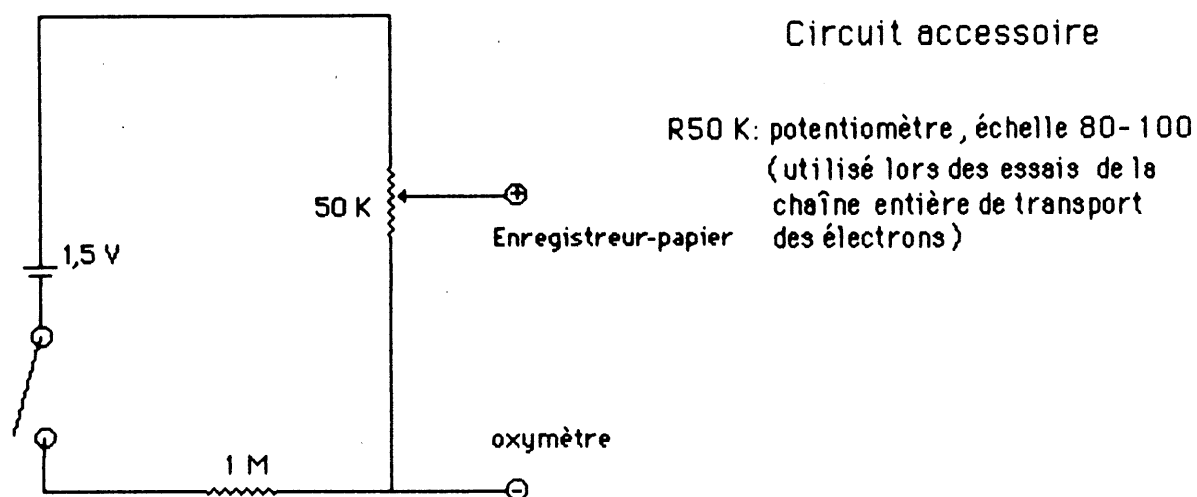
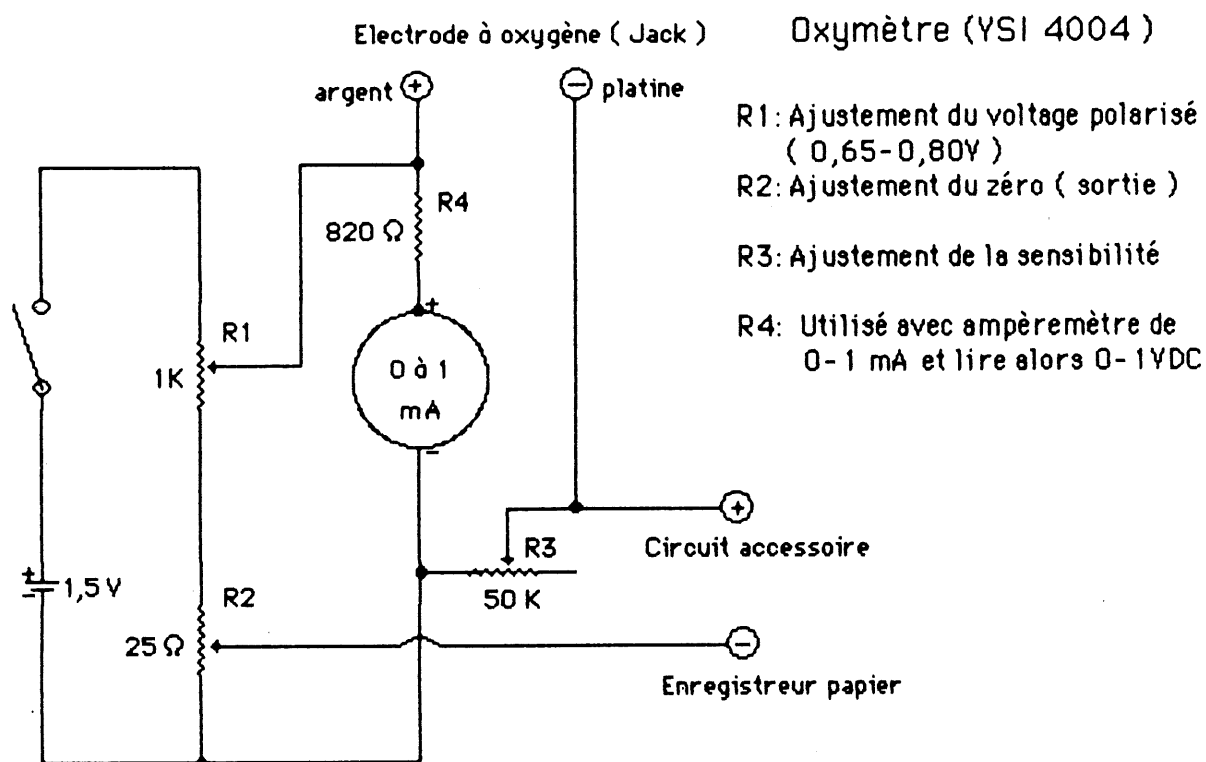


FIG. A8.2: Plan du circuit électrique de l'oxymètre (YSI 4004) et du circuit accessoire.

Lors de l'étude du transport photosynthétique des électrons sur la chaîne entière, le circuit "accessoire" (Bucking box) permet de modifier l'échelle de l'enregistreur-papier calibré de 0-100 à 80-100 (figure A 8.2). Le voltage de l'enregistreur est réglé à 1 mV et l'ajustement à 100 est réglé grâce au potentiomètre. De cette façon, la sensibilité du système est augmentée par un facteur de 5 dont il faut d'ailleurs tenir compte lors du calcul du taux d'oxygène consommé. Par ailleurs, lorsque l'activité réductrice est faible, la pente se mesure avec plus de précision. La comparaison du taux d'oxygène consommé pour deux voltages différents (1 et 5 mV) indique qu'il y a peu d'écart dans les résultats (tableau A 8.1). La concentration de chlorophylle (mg/ml) exerce une très grande influence sur l'activité photosynthétique mesurée (figure A 8.3). L'activité diminue graduellement avec l'augmentation de la teneur en chlorophylle du milieu de suspension des chloroplastes. La diminution est associée à l'opacité de la suspension pour les fortes concentrations de chlorophylle.

TABLEAU A 8.1: Variation du taux de consommation d'oxygène par une suspension des chloroplastes de *L. minor* témoins pour deux voltages différents de l'enregistreur (1 et 5 mV)

Voltage mV	consommation O ₂ μmoles/mg chl/h
1	47
1	47
5	45
5	45

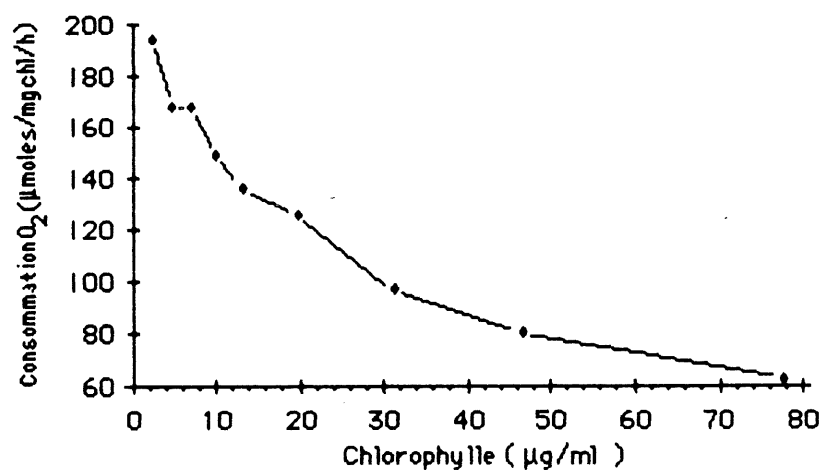


FIG. A 8.3: Influence de concentrations variées de chlorophylle sur la consommation d'oxygène par des chloroplastes de *L. minor* lors de la mesure du transport des électrons au niveau du PS I.

Annexe 9: influence de l'atrazine et de l'intensité lumineuse sur l'activité du PS II

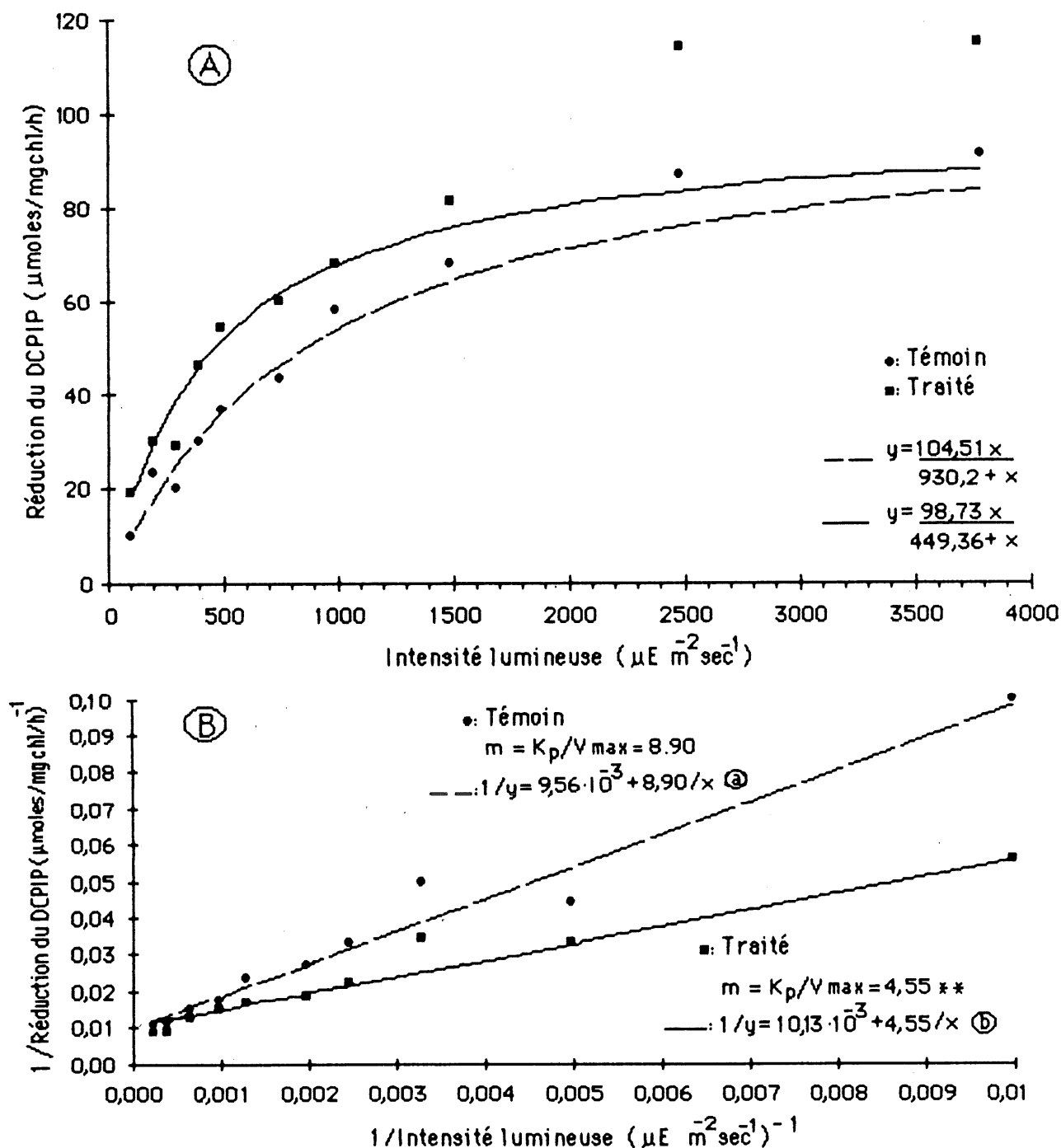


FIG. A 9.1. Courbe de saturation lumineuse pour la réduction du DCPIP d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B).

** $P < 0,01$ (T-test)

(A): $R^2 = 0,96$, $r = 0,98$, $\sqrt{S^2_{yx}}/\bar{y} = 0,166$ (B): $R^2 = 0,94$, $r = 0,97$, $\sqrt{S^2_{yx}}/\bar{y} = 0,169$

Annexe 9: (suite)

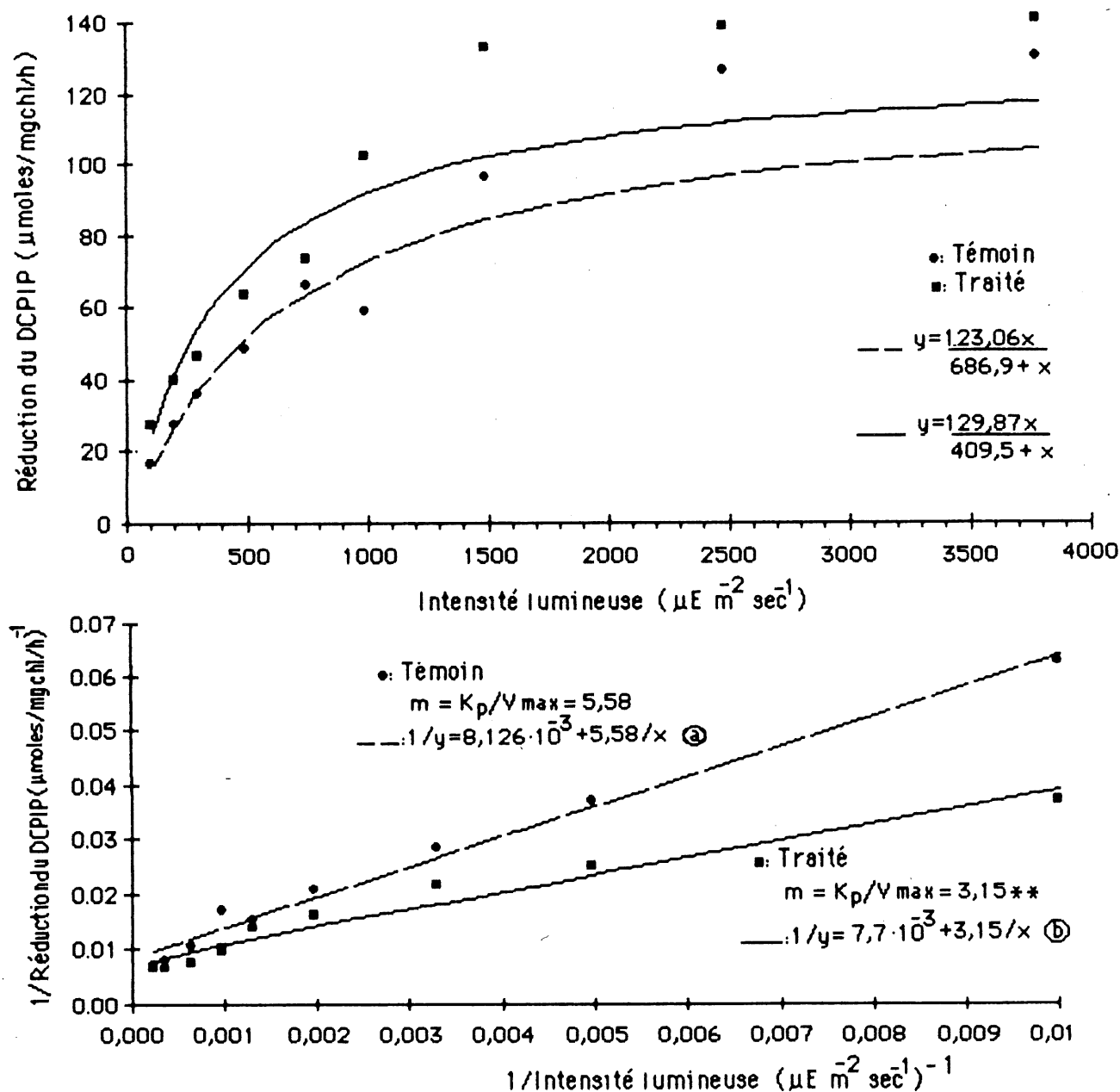


FIG. A 9.2: Courbe de saturation lumineuse pour la réduction du DCPIP d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B).

** $P < 0,01$ (T-test)

③: $R^2 = 0,99$, $r = 0,99$, $\sqrt{S_{ux}^2/\bar{y}} = 0,092$, ④: $R^2 = 0,95$, $r = 0,97$, $\sqrt{S_{ux}^2/\bar{y}} = 0,177$

Annexe 10: Influence de l'atrazine et de l'intensité lumineuse
sur l'activité du PS I.

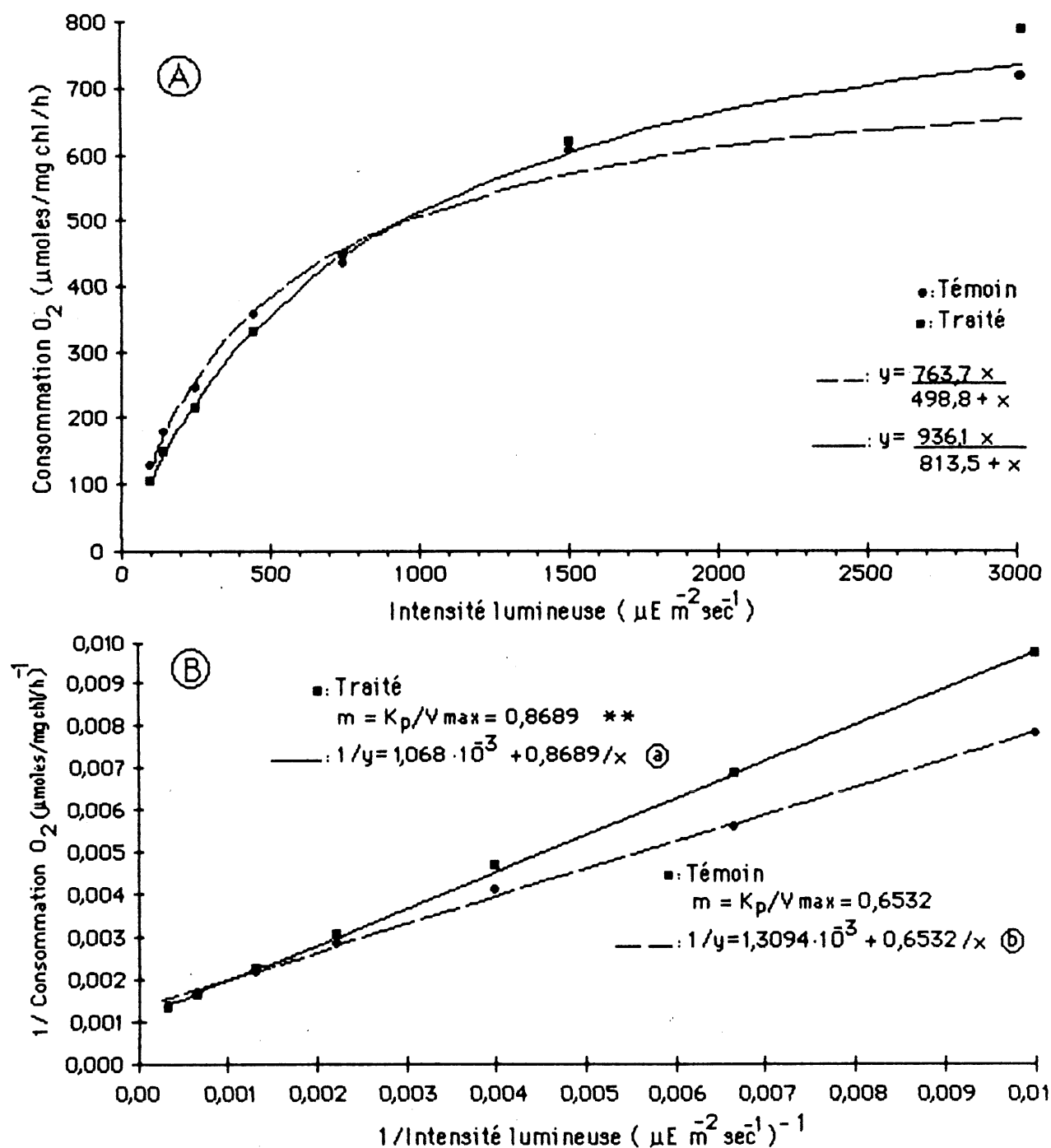


FIG. A 10.1: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B).

** $P < 0,01$ (T-test)

(a): $R^2 = 0,99$, $r = 0,99$, $\sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,018$ (b): $R^2 = 0,99$, $r = 0,99$, $\sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,034$

Annexe 11: Influence de l'atrazine et de l'intensité lumineuse sur l'activité photosynthétique de la chaîne entière de transport des électrons.

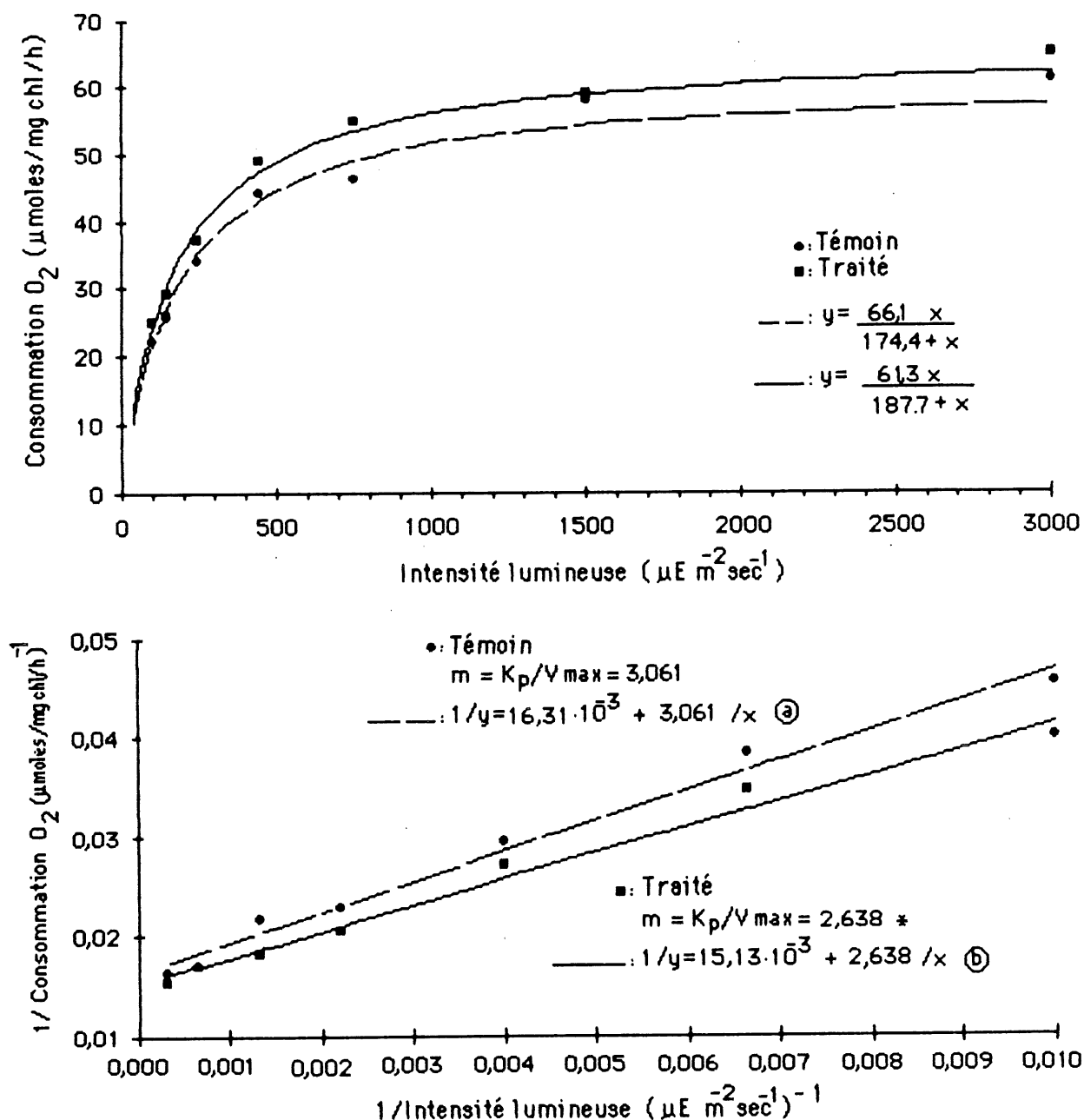


FIG. A11): Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)

* $P < 0,05$ (T-test)

(a): $R^2 = 0,98, r = 0,99, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,052$ (b): $R^2 = 0,98, r = 0,99, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,052$

Annexe 11: (suite)

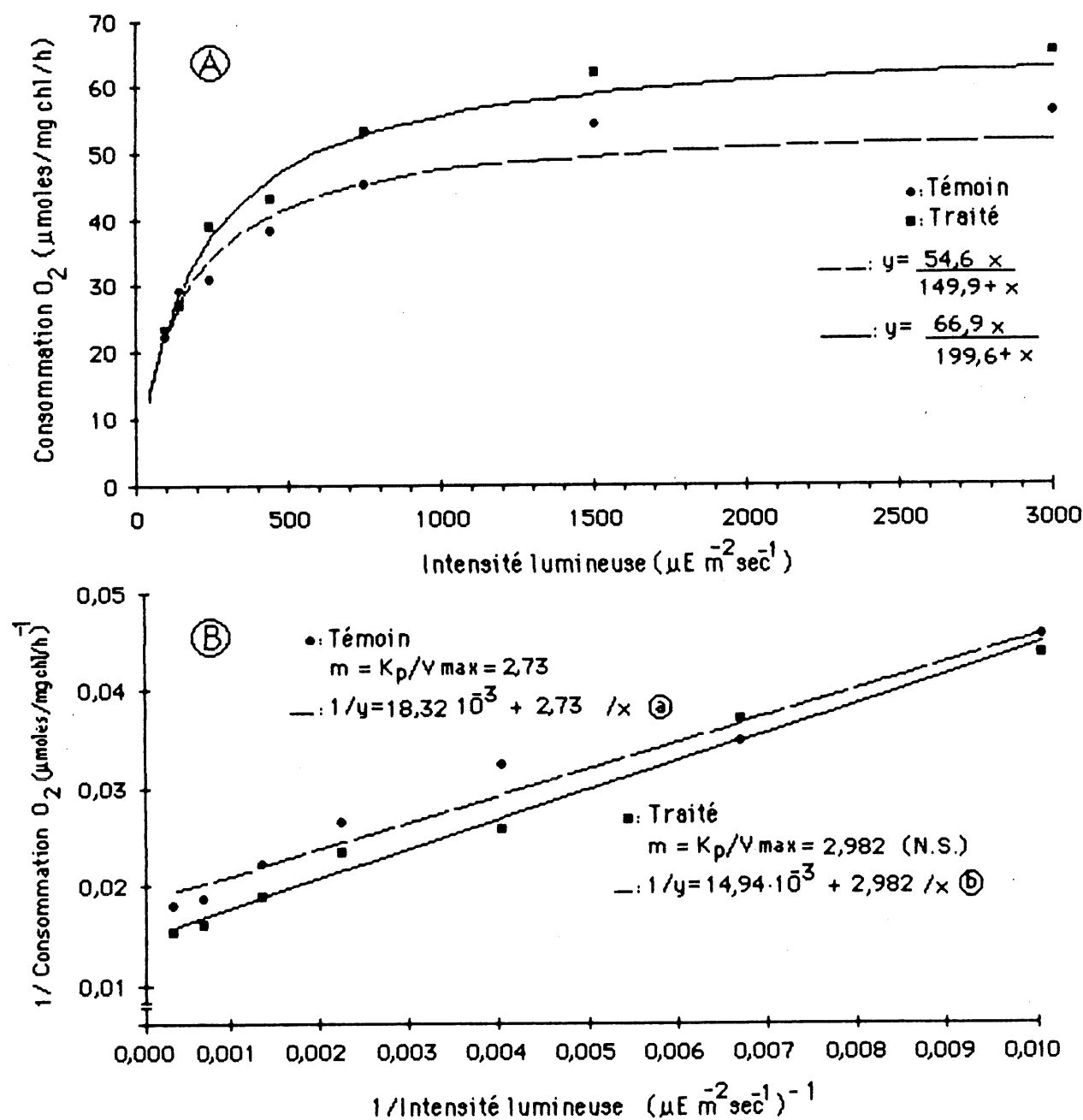


FIG. A 11.2: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B).

N.S.: non significatif, $Pr. > 0,05$

③: $R^2=0,96, r=0,98, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,073$ ④: $R^2=0,98, r=0,99, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,06$

Annexe 11: (suite)

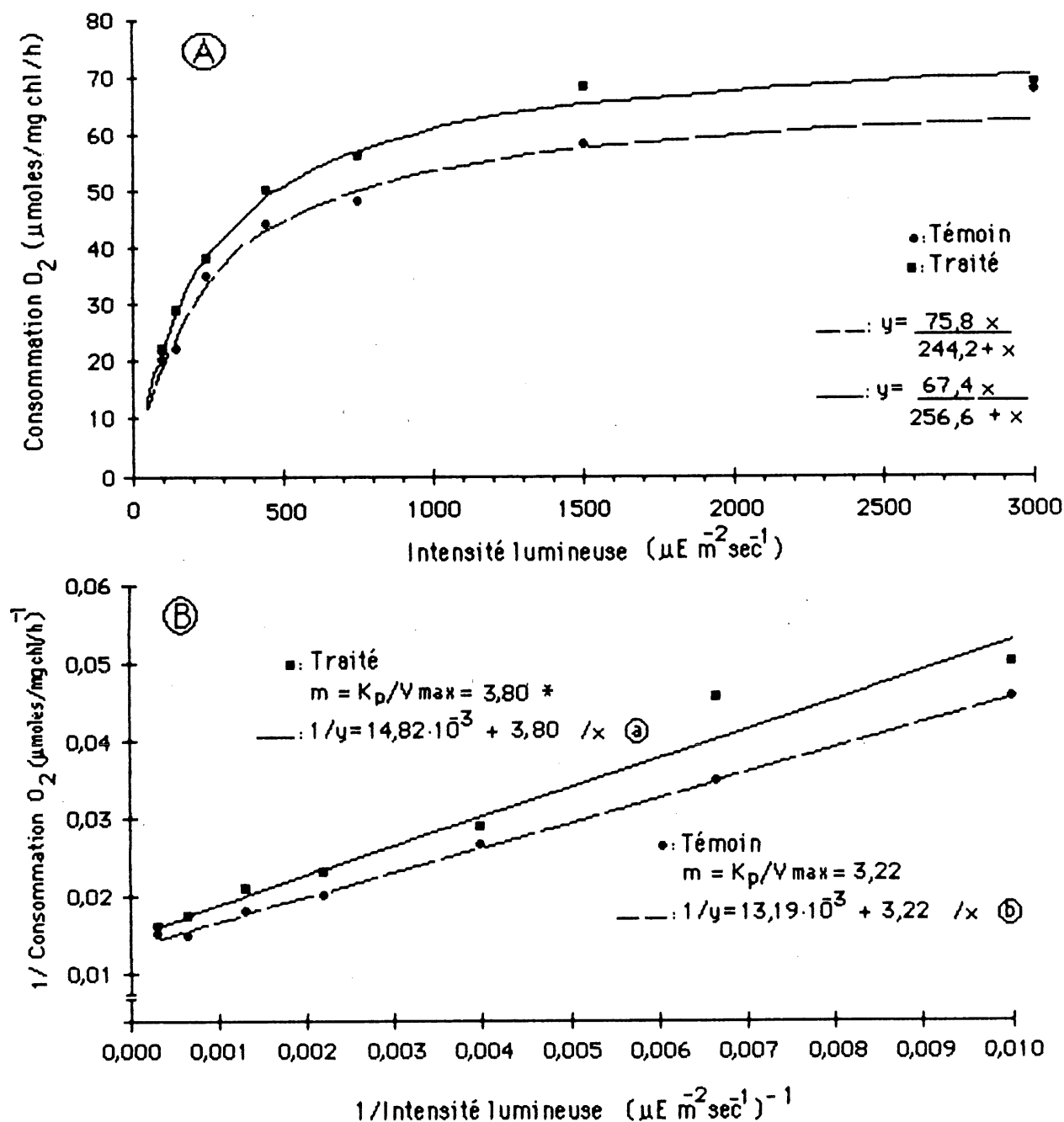


FIG. A 11.3: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B).

* $P < 0,05$ (T'-test)

③: $R^2=0,99, r=0,99, \sqrt{s_{yx}^2/\bar{y}} = 0,018$ ⑥: $R^2=0,96, r=0,98, \sqrt{s_{yx}^2/\bar{y}} = 0,099$

Annexe 11: (suite)

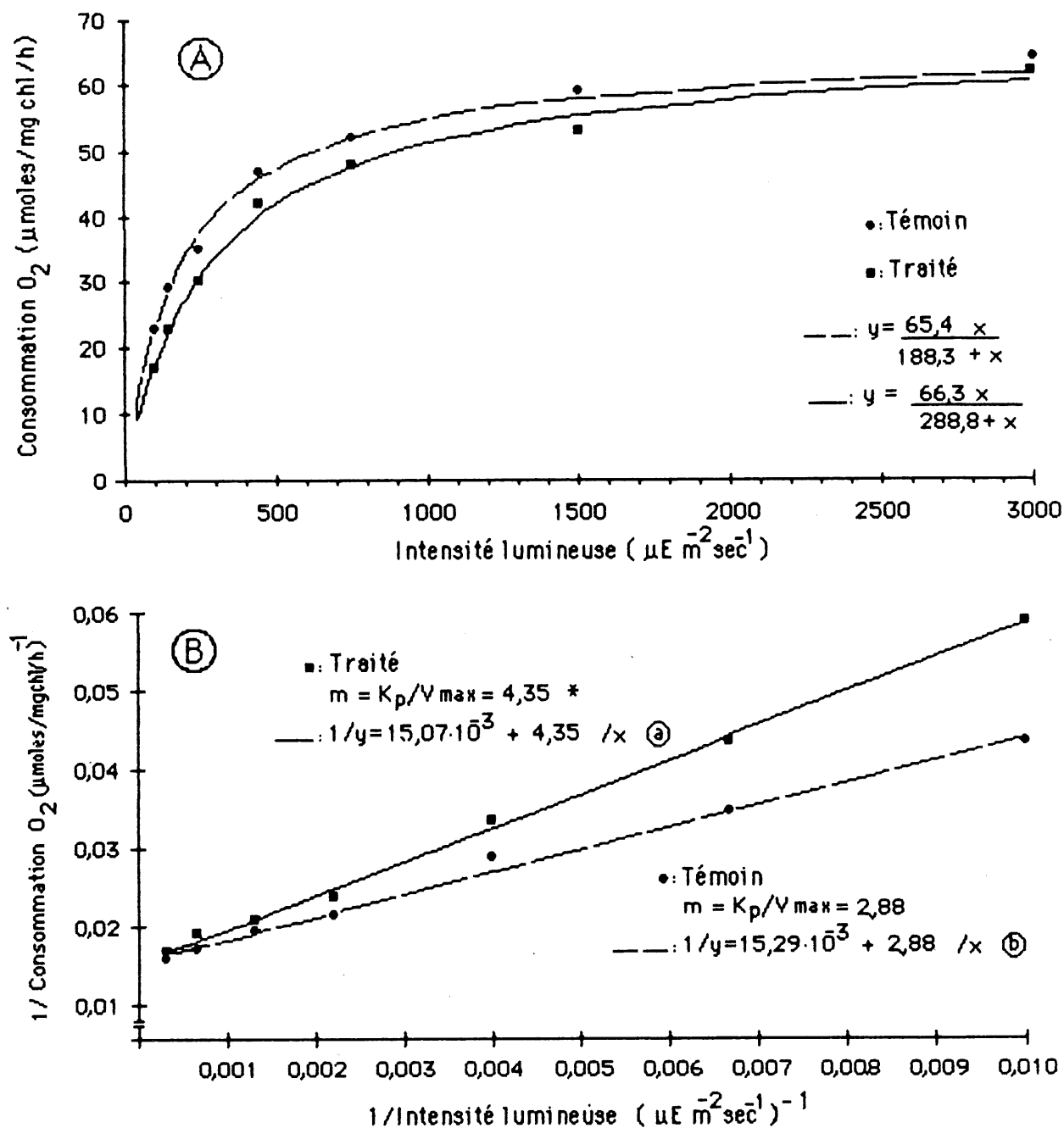


FIG. A 11.4: Courbe de saturation lumineuse pour la consommation d'oxygène par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine (A) et expression linéaire des résultats (B)

* $P < 0,05$ (T'-test)

(a): $R^2=0,99, r=0,99, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,025$ (b): $R^2=0,99, r=0,99, \sqrt{S_{yx}^2/\bar{y}} = 0,035$

Annexe 12: Durée de conservation des chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine *in vitro*; influence sur l'émission de la fluorescence à 680 nm en présence de $MgCl_2$ et sur l'activité photosynthétique du PS I et de la chaîne entière du transport des électrons.

Lors de l'étude de la durée de conservation *in vitro* des membranes photosynthétiques, les procédures expérimentales sont identiques à celles décrites au chapitre 2. La durée de conservation des chloroplastes (figure A 12.1) influence considérablement la capacité des cations à provoquer une augmentation de l'intensité de la fluorescence. En fait, la fluorescence émise par les chloroplastes de plantes témoins diminue de 51% à 5 ° C et de 56% à 23 ° C après plus de 6 heures de conservation. Pour la même durée, la diminution équivaut à 20% à 5 ° C et à 48% à 23 ° C chez les chloroplastes de plantes traitées. De même l'activité photosynthétique du PS I diminue graduellement après une période de latence de deux à trois heures chez les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées, lorsqu'ils sont conservés dans la glace fondante (figure A 12.2 et A 12.3). Les chloroplastes de plantes traitées semblent vieillir moins rapidement que ceux de plantes témoins. De fait, après environ 6 heures de conservation, les chloroplastes de plantes témoins ont une activité photosynthétique plus faible que ceux de plantes traitées. En effet, l'activité photosynthétique du PS I diminue d'environ 25% (moyenne des deux expériences) entre 5 et 6 heures après le début de l'extraction des chloroplastes contre 14% chez ceux de plantes traitées. L'activité de la chaîne entière paraît plus stable avec le temps que celle du transport des électrons au niveau du PS I (figure A 12.4).

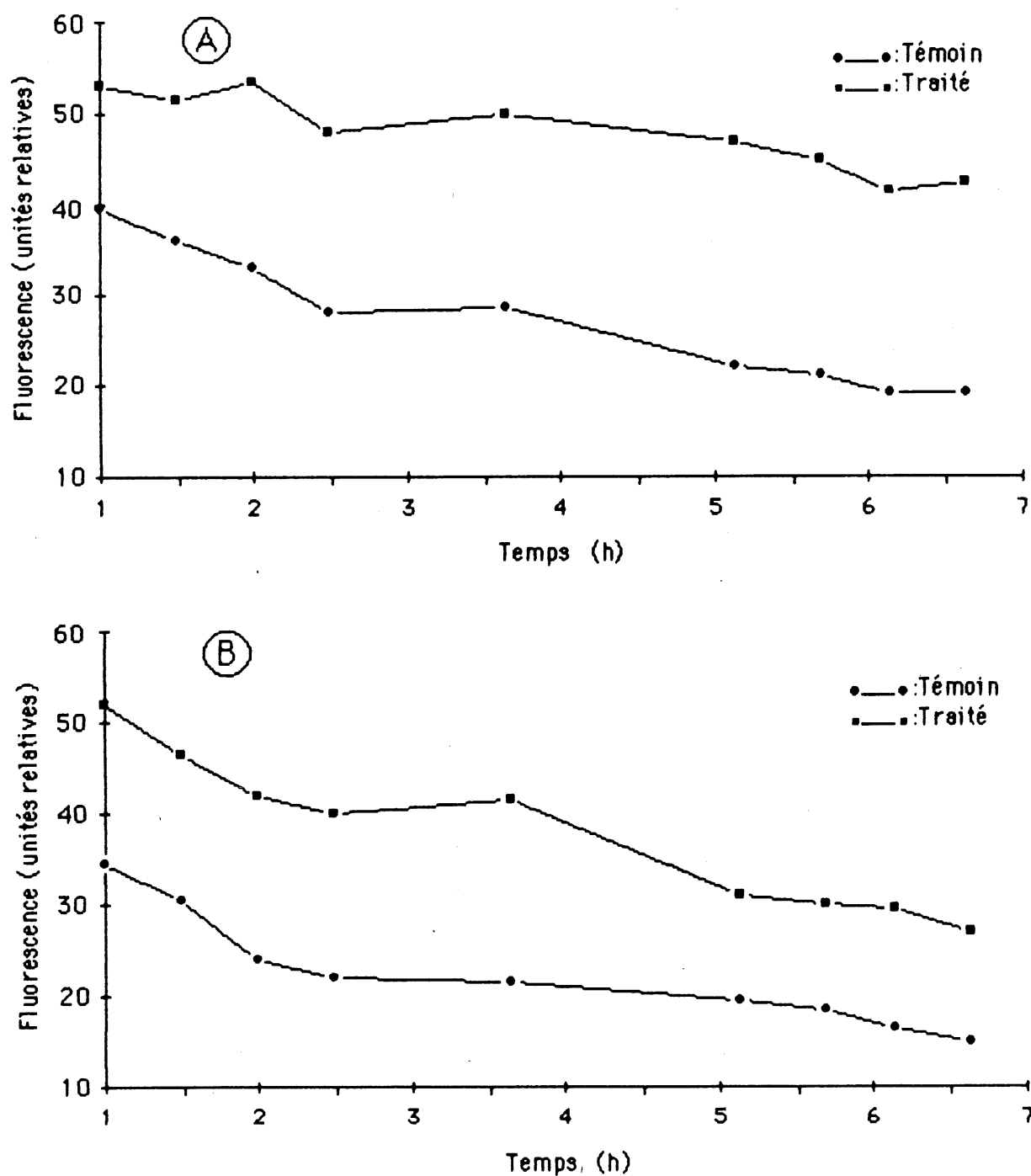


FIG. A 12.1: Effet de la durée de conservation sur l'intensité de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées par 0,25 ppm d'atrazine en présence de 1 mM de $MgCl_2$ et conservée à 5°C (A) ou à 23°C (B).

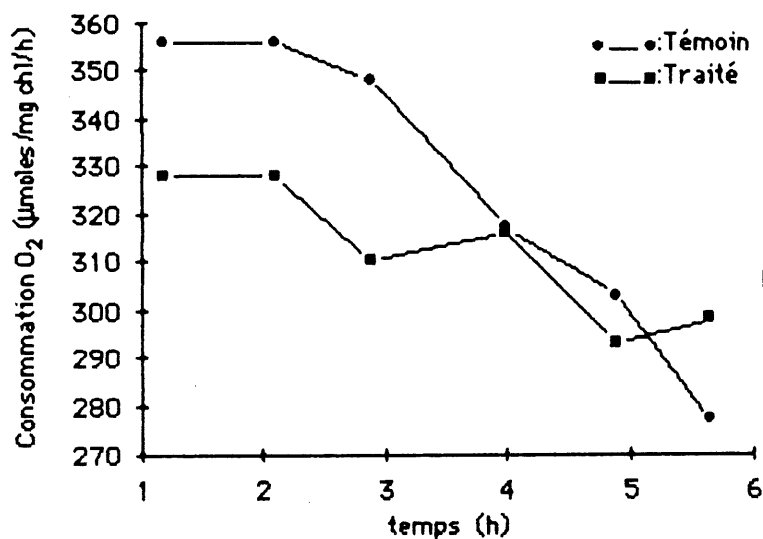


FIG. A 12.2: Effet de la durée de conservation sur l'activité photosynthétique du PS I par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

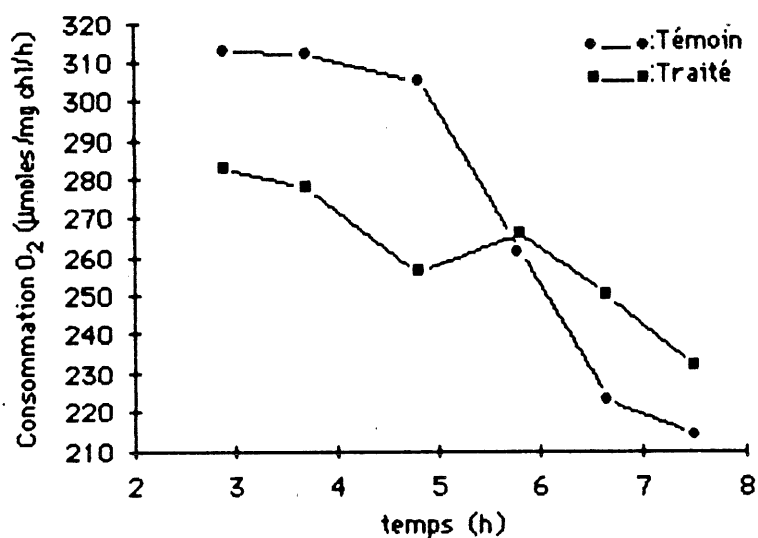


FIG. A 12.3: Effet de la durée de conservation sur l'activité photosynthétique du PS I par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

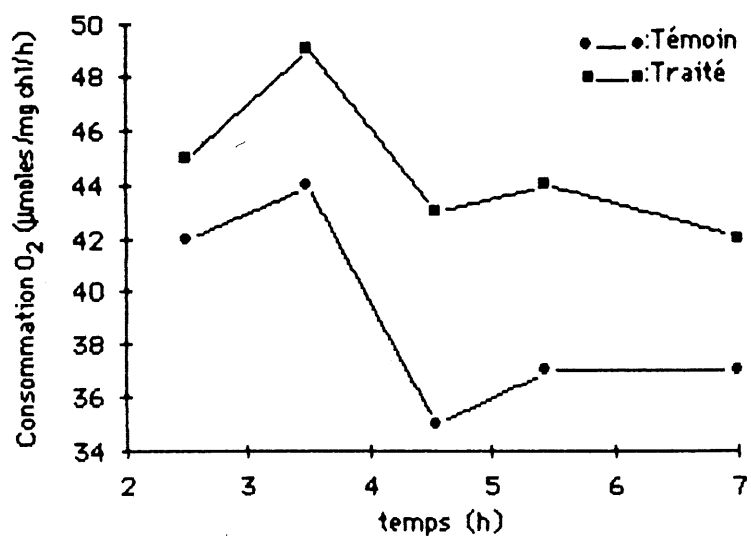


FIG. A 12.4: Effet de la durée de conservation sur l'activité photosynthétique de la chaîne entière de transport des électrons par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine.

Il semble que le traitement des plantes par 0,25 ppm d'atrazine permette aux chloroplastes de maintenir une activité photosynthétique plus longtemps en prolongeant la durée de conservation *in vitro*. Le vieillissement des membranes photosynthétiques *in vitro* serait lié à la dégénérescence de la matrice lipidique (GINKEL et FORK, 1981; VENEDIKTOV et KRIVOSHEJEVA, 1983), ainsi qu'à la dégradation du contenu pigmentaire des chloroplastes et à la détérioration du complexe membranaire responsable de l'oxydation de l'eau au niveau du PS II (PANIGRAHI et BISWAL, 1979a, 1979b). Toutefois, la dégradation des pigments est très faible dans l'obscurité et dans les premières heures qui suivent l'extraction des chloroplastes. De plus, le complexe membranaire responsable de l'oxydation de l'eau n'est pas impliqué dans la réaction photosynthétique pour le PS I. Cela suggère que le vieillissement moins prononcé que nous avons observé chez les chloroplastes de plantes traitées serait plutôt attribuable aux modifications observées dans la composition lipidique (GRENIER et al., 1979; LAROCHE, 1983). WINTERMANS et al. (1969) ont observé une activité de la monogalactolipase en présence de NaCl qui conduit à la libération d'acides gras libres, notamment le C₁₈-insaturé. SIEGENTHALER et al. (1972 & 1977) ont également montré que l'ajout d'acides gras libres insaturés provoque une diminution des réactions photosynthétiques similaires à celles que l'on observe lors du vieillissement des plastes. CHOW et BARBER (1980) ont montré que la présence d'acide linoléique libre empêche l'empilement granaire *in vitro*. De plus, BARBER & al. (1980) suggèrent que la libération d'acide linoléique causerait une diminution importante de la fluidité des membranes, ce qui entraverait l'accolement thylakoïdien en présence de cations.

Annexe 13: Temps minimum nécessaire à une émission maximale de l'intensité de la fluorescence en présence de 1 mM de $MgCl_2$ par une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traitées à l'atrazine.

L'augmentation d'intensité de la fluorescence est mesurée en fonction du temps à partir d'une suspension de chloroplastes (2 ml) contenant 5 µg/ml de chlorophylle après y avoir ajouté 20 µl d'une solution de $MgCl_2$ à 100 mM.

Le magnésium provoque une augmentation de la fluorescence de 11,5 unités (50%) chez les chloroplastes de plantes témoins et d'à peine 2,5 unités chez les chloroplastes de plantes traitées (figure A 13.1). Chez les témoins, le seuil maximum est atteint environ 200 s après l'introduction de 1 mM de $MgCl_2$. Il semble que l'introduction du magnésium sous une forme relativement concentrée interfère avec le processus d'émission de la fluorescence chez les chloroplastes de plantes traitées, puisque pour le même échantillon, la procédure habituelle (introduction d'une aliquote de chloroplastes dans une solution contenant 1 mM de $MgCl_2$) amène une augmentation de la fluorescence d'environ 13 unités contre 16 unités pour les témoins. De ce fait, il est relativement difficile de comparer le temps minimum requis pour atteindre le seuil maximum de la fluorescence entre les chloroplastes de plantes témoins et ceux de plantes traitées.

Le seuil maximum de la fluorescence est atteint après 140 à 180 s pour les chloroplastes d'épinard et de 180 à 350 s pour les chloroplastes de pois (GROSS et HESS, 1973; BRIANTAIS et al., 1984; BARBER et MALKIN, 1981). Ces périodes de temps correspondraient à la diffusion des complexes protéiques

chargés à travers la membrane photosynthétique. De plus, le traitement des membranes par le cholestérol affecte la fluidité des membranes et inhibe l'augmentation de la fluorescence en présence de cations et la ségrégation des complexes protéiques. Le temps pour atteindre le seuil maximum de la fluorescence varie avec la température et avec l'âge des chloroplastes qui affecte aussi la fluidité membranaire selon BARBER (1980) et BRIANTAIS & al. (1984).

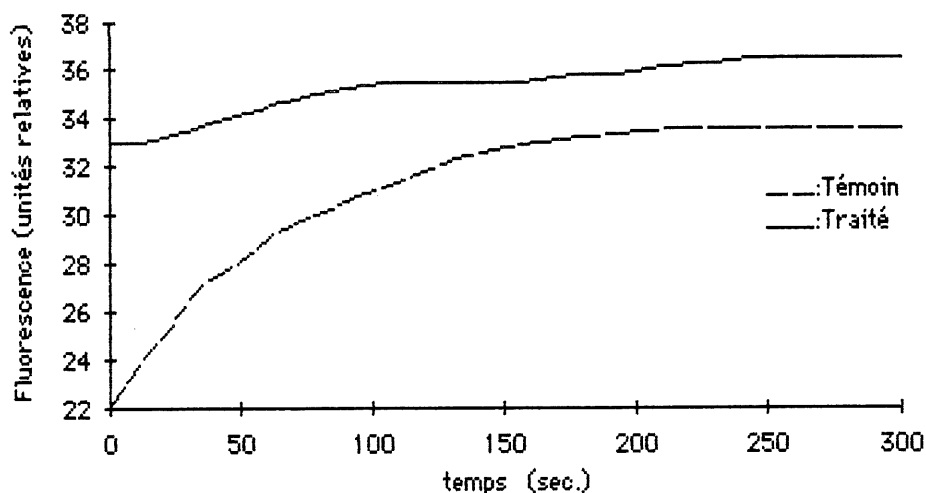


FIG. A 13.1: Augmentation de la fluorescence d'une suspension de chloroplastes de *L. minor* témoins et traités par 0,25 ppm d'atrazine en présence de 1mM de $MgCl_2$.

BIBLIOGRAPHIE

- AHRENS, W. H., C. J. ARNTZEN et E. W. STOLLER. 1981. Chlorophyll fluorescence assay for the determination of triazine resistance. *Weed Sci.*, 29: 316-322.
- ALI, A. et V. SOUZA MACHADO. 1981. Rapid detection of 'triazine resistant' weeds using chlorophyll fluorescence. *Weed Res.*, 21: 191-197.
- ALLEN, J. F. 1983. Protein phosphorylation-carburettor of photosynthesis? *Trends Biochem. Sci.*, 8: 369-373.
- ANDERSON, J. M., J. C. WALDRON et S. W. THORNE. 1978. Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. *FEBS Lett.*, 92: 227-333.
- ANDERSON, J. M. 1980. Chlorophyll-protein complexes of higher plant thylakoids: distribution, stoichiometry and organization in photosynthetic unit. *FEBS Lett.*, 117: 327-331.
- ANDERSON, J. M. 1981. Consequence of spatial separation of photosystem I and photosystem II in thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Lett.*, 124: 1-10.
- ANDERSON, J. M. 1982. The significance of grana stacking in chlorophyll b-containing chloroplasts. *Photobiochem. Photobiophys.*, 3: 225-241.

- ANDERSON, J. M. et A. MELIS. 1983. Localisation of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 745-749.
- ANDERSON, J.M. 1984. A chlorophyll a/b-protein complex of photosystem I. *Photobiochem. Photobiophys.*, 8: 221-228.
- ANDERSSON, B. et J. M. ANDERSON. 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 593: 427-440.
- ANDERSSON, B. et W. HAEHNEL. 1982. Location of photosystem I and photosystem II reaction centers in different thylakoid regions of stacked chloroplasts. *FEBS Lett.*, 146: 13-17.
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J. H. et G. AKYOYUNOGLU. 1977. Correlation between cation-induced formation of heavy subchloroplast fractions and cation-induced increase in chlorophyll a fluorescence yield in tricine-washed chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 179: 370-377.
- ARMOND, P. A., C. J. ARNTZEN, J.-M. BRIANTAIS et C. VERNOTTE. 1976. Differentiation of chloroplast lamellae. Light harvesting efficiency and grana development. *Arch. Biochem. Biophys.*, 175: 54-63.

- ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24: 1-15.
- ARNTZEN, C. J., P.A. ARMOND, J.-M. BRIANTAIS, J. J. BURKE et W. P. NOVITZKY. 1976. Dynamic interactions among structural components of the chloroplast membrane. Brookhaven Symp. Biol., 28: 316-337.
- ARNTZEN, C. J., D. J. KYLE et I. OHAD. 1984. Photoinhibition: A consequence of the accelerated breakdown of the apoprotein of the secondary electron acceptor of photosystem II. in: Biosynthesis of the photosynthetic apparatus molecular biology development and regulation. Ed. J.P. THORNER, L.A. STAEHELIN et R.B. HALLICK. A. R. LISS inc. p. 313-324.
- ARO, E.-M., E. RINTAMÄKI, P. KORHONEN et P. MÄENPÄÄ. 1986. Relationship between chloroplast structure and O_2 evolution rate leaf discs in plants from different biotypes in South Finland. Plant, Cell and Environ., 9: 87-94.
- BAKER, N. R. et K. HARDWICK. 1974. A model for the development of photosynthetic units. Proc. Int. Congr. Photosynth. Res., 3: 1897-1906.
- BAKER, N. R. et P. J. DOMINY. 1980. Cation regulation of factors limiting primary photochemistry in spinach chloroplasts. Photobiochem. Photobiophys., 1: 155-160.

BARBER, J. 1977. Thylakoid membrane surface charges in relation to prompt and delayed chlorophyll fluorescence. In: Bioenergetic of membranes. Ed. L. PACKER et al., Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p. 459-468.

BARBER, J. et W. S. CHOW. 1979. A mechanism for controlling the stacking and unstacking of chloroplast thylakoid membranes. FEBS Lett., 105: 5-10.

BARBER, J. 1980. An explanation for the relationship between salt-induced thylakoid stacking and the chlorophyll fluorescence changes associated with changes in spillover of energy from photosystem II to photosystem I. FEBS Lett., 118: 1-10.

BARBER, J. , W. S. CHOW, C. SCOUFFLAIRE et R. LANNOYE. 1980. The relationship between thylakoid stacking and salt-induced chlorophyll fluorescence changes. Biochem. Biophys. Acta. 591: 92-103.

BARBER, J., et S. MALKIN. 1981. Salt-induced microscopic changes in chlorophyll fluorescence distribution in the thylakoid membranes. Biochem. Biophys. Acta. 643: 344-349.

BARBER, J. 1982. Influence of surface charges on thylakoid structure and function. Ann. Rev. Plant Physiol., 33: 262-295.

BARBER, J., R. C. FORD, R. A. C. MITCHELL et P. A. MILLNER. 1984. Chloroplast

thylakoid membrane fluidity and its sensitivity to temperature.
Planta 161: 375-380

BEAUMONT, G., R. BASTIN, H. P. THERRIEN. 1976a. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor* L. I. influence sur la croissance, la teneur en chlorophylle, en protéine et en azote soluble et totale. *Nat. Can.* 103: 535-541.

BEAUMONT, G., R. BASTIN et H. P. THERRIEN. 1976b. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor* L. II. Influence sur la photosynthèse et sur la respiration. *Nat. Can.*, 103: 535-541.

BEAUMONT, G., R. BASTIN et H. P. THERRIEN. 1978. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor* L. III. Influence sur les protéines solubles et les acides nucléiques. *Nat. Can.*, 105: 103-113.

BEAUMONT, G., A. LORD et G. GRENIER. 1980. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor* L. V. Influence sur l'ultrastructure des chloroplastes. *Can. J. Bot.*, 58: 1571-1577.

BEN-HAYYIN, G. et G. H. KRAUSE. 1980. Transport of mono- and divalent cations across chloroplast membranes mediated by the ionophore A23187. *Arch. Biochem. Biophys.*, 202: 546-557.

BENNET, J. 1984. Control of protein turnover by photosynthetic electron transport. *Nat.*, 310: 547-548.

- BISHOP, D. G., K. S. ANDERSON et R.M. SMILLIE. 1971. The distribution of galactolipids in mesophyll and bundle sheath chloroplast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 42: 74-81.
- BOSE, S. et C. J. ARNTZEN. 1978. Reversible inactivation of photosystem II reaction centers in cation depleted chloroplast membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 185: 567-575.
- BOSE, S., J. E. MULLET, G. E. HOCH et C. J. ARNTZEN. 1981. Effects of cations on photosystem I electron transport. *Photobiochem. Photobiophys.* 2: 45-52.
- BOSE, S. 1982. Chlorophyll fluorescence in green plants and energy transfer pathways in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, 36: 725-731.
- BOWES, J. M., P. HORTON et D. S. BENDALL. 1981. Does the acceptor Q₂ fulfil an indispensable function in the primary reactions of photosystem II? *FEBS Lett.*, 135: 216-264.
- BRIANTAIS, J.-M., C. VERNOTTE et B. MAISON. 1982. Influence of stacking of the distribution of light energy in the photosynthetic apparatus. *Physiol. Vég.*, 20: 111-122.
- BRIANTAIS, J.-M., C. VERNOTTE, J. OLIVE et F.-A. WOLLMAN. 1984. Kinetics of cation-induced changes of photosystem II fluorescence and of lateral

distribution of the two photosystems in the thylakoid membranes of pea chloroplast. *Biochem. Biophys. Acta*, 766: 1-8.

BROADMAN, N. K. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 28: 355-377.

BROADMAN, N. K. et J. M. ANDERSON. 1978. Composition, structure and photochemical activity of developing and mature chloroplasts. Dans: *Chloroplast development*. Ed. G. AKOYUNOGLU et J. H. ARGYROUDI-AKOYUNOGLU. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. N.-Y. p. 1-14.

BROWES, J., P. MCCOURT et C. R. SOMERVILLE. 1985. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplast-specific lipid. *Sci.*, 227: 763-765.

BURKE, J. J., C. L. DITTO et C. J. ARNTZEN. 1978. Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 187: 252-263.

BUSCHAMANN, C. D., D. MIER, H. K. KLENDGEN et H. K. LICHTENTHALER. 1978. Regulation of chloroplast development by red and blue light. *Photochem. Photobiol.*, 27: 195-198.

BUTLER, W. L., M. KITAJIMA. 1975. Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.*, 396: 72-85.

- BUTLER, W. L. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29: 345-378.
- CHOW, W. S. et J. BARBER. 1980. Further studies of the relationship between cation-induced chlorophyll fluorescence and thylakoid membrane stacking changes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 593: 149-157.
- CHOW, W. S., R. C. FORD et J. BARBER. 1981. Possible effects of the detachment of stromal lamellae from granal stacks on salt-induced changes in spillover. *Biochem. Biophys. Acta.*, 635: 317-326.
- COTHBERT, D. et F. S. WOOD. 1980. Fitting equations to data computer analysis of multifactor data. Ed. John Wiley & sons. N. Y. 458 p.
- DARR, S., V. SOUZA MACHADO et C. J. ARNTZEN. 1981. Uniparental inheritance of chloroplast phototystem II polypeptide controlling herbicide binding. *Biochem. Biophys. Acta.*, 635: 219-218.
- DAVIS, D. J., P. A. ARMOND, E. L. GROSS et C. J. ARNTZEN. 1976. Differentiation of chloroplast lamellae onset of cation regulation of excitation energy distribution. *Arch. Biochem. Biophys.*, 175: 64-70.
- DAVIS, D. J. et E. L. GROSS. 1975. Protein-protein interactions of light-harvesting pigment protein from spinach chloroplasts. I. Ca^{+2} binding and its relation to protein association. *Biochem. Biophys. Acta.* 387: 557-567.

- DELIEU, T. et D. A. WALKER. 1972. An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.*, 71: 201-225.
- DESHAIES, R. J., L. E. FISH et A. T. JAGENDORF. 1984. Permeability of chloroplast envelopes to Mg^{+2} . *Plant Physiol.*, 74: 956-961.
- DRAPER, N. R. et H. SMITH. 1981. *Applied regression analysis*. Ed. John Wiley and sons. N. Y. 709 p.
- DUFRESNE, A. 1978. Spectroscopie de chloroplastes en suspension. Mémoire de Maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières. 225 p.
- DUNAHAY, T. G. et L. A. STAEHELIN. 1985. Isolation of photosystem I complexes from octyl glucoside/sodium dodecyl sulfate solubilized spinach thylakoids. *Plant Physiol.*, 78: 606-613.
- DUVAL, D. 1974. Etude de la localisation de cations au niveau des protéines des membranes plastidiales chez *Zea mays* L. Thèse de doctorat. Université de Paris-Sud, centre d'Orsay, France. 113 p.
- DUYSENS, L. N. M. 1956. The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. *Biochem. Biophys. Acta.*, 19: 1-10.
- DUYSENS, L.N.M. et H. E. SWEERS. 1963. Mechanism of the two photochemical

reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. Ed. In S Miyachi. University of Tokyo Press. p. 353-372.

DUYSENS, M. E., T. P. FREEMAN, N. D. WILLIAMS et L. L. OLSON. 1984. Regulation of excitation energy in wheat mutant deficient in light-harvesting pigment protein complex. *Plant. Physiol.*, 76: 561-566.

DUVAL, J.-C., J.-P. DUBACQ et A. TREMOLIERES. 1980. A hypothetic role for phosphatidylglycerol and 3-trans-hexadecenoic acid in the light reactions of the photosynthetic process. In: Biogenesis and function of plant lipids. Ed. P. MAZLIAK, P. BENVENISTE, C. COSTES et R. DOUCE. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. p. 91-94.

GEROLA, P. D. 1981. Thylakoid membrane stacking: structure and mechanism. *Physiol. Vég.*, 19: 565-580.

GHIRANDI, M. L. et A. MELIS. 1984. Photosystem electron-transport capacity and light-harvesting antenna size in maize chloroplast. *Plant Physiol.*, 74: 993-998.

GIMMLER, H., G. SCHAFER et U. HEBER, 1975. Low permeability of the chloroplast envelope toward cations. Dans: Proceedings of the third international congress on photosynthesis. Ed. M. AVRON. Elsevier, N.-Y. p. 1381-1392.

- GINDEL, G. V. et D. C. FORK. 1981. The effects of ageing of spinach chloroplasts *in vitro* on the phase transition temperatures of thylakoid membranes. Photobiochem. Photobiophys., 2: 239-249.
- GOULD, J. M. et S. IZAWA. 1973. Studies on the energy coupling sites of photophosphorylation I. Separation of site I and site II by partial reactions of the chloroplast electron transport chain. Biochem. Biophys. Acta, 314: 211-223.
- GOVINDJEE, G. PARAGEORGIU et E. RABINOWITCH. 1973. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. Dans: Practical fluorescence; theory, methods and technics. Ed. G.G. GUILBAULT DEKKER, N.-Y. p. 543-575.
- GRENIER, G., J. P. MARIER et G. BEAUMONT. 1979. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor*. L. IV. Influence sur la composition lipidique. Can. J. Bot., 57: 1015-1020.
- GRENIER, G., J. P. MARIER et G. BEAUMONT. 1982. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor*. VI. Influence sur les classes importantes de phospholipides. Physiol. Veg., 20: 179-185.
- GRENIER, G. et G. BEAUMONT. 1983. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor*. VII. Incorporation d'acétate-1,2-(¹⁴C) dans les groupes de lipides et leurs acides gras. Physiol. Plant., 57: 477-484.

- GRENIER, G., L. PROTEAU, J. P. MARIER et G. BEAUMONT. 1897. Effects of a sublethal concentration of atrazine on the chlorophyll and lipid composition of chlorophyll-protein complexes of *Lemna minor*. Plant Physiol. Biochem., 25 (4): 409-413.
- GRIFFITH, M., N. P. A. HUNER ET D. J. KYLE. 1984. Fluorescence properties indicate that photosystem II reaction centers and light-harvesting complex are modified by low temperature growth in Winter Rye. Plant Physiol., 76: 381-385
- GROSS, E. L. et S. HESS. 1973. Monovalent cation induced inhibition of chlorophyll a fluorescence: antagonism by divalent ions. Arch. Biochem. Biophys., 159: 832-836.
- GROSS, E. L. et S. H. PRASHER. 1974 . Correlation between monovalent cation-induced decreases in chlorophyll a fluorescence and structural changes. Arch. Biochem. Biophys., 164: 460-468.
- GROUZIS, J.P., M. RAMBIER et C. GRIGNON. 1982. The stacking of the thylakoids of two Leguminosae: differential responses to H^+ and divalent cations. Biochem. Biophys. Acta, 679: 131-137.
- GUILLOT-SALOMON, T.-A., A. TREMOLIERES, C. TUQUET et J. P. DUBACQ. 1980. Trans-3-hexadecenoic and grana stacking. In: Biogenesis and function of plant lipids. Ed. P. MAZLIAK, P. BENVENISTE, C. COSTES et R. DOUCE. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. p. 95-98.

- HAWORTH, P., J. L. WASTON et C. J. ARNTZEN. 1983. The detection, isolation and characterization of light-harvesting complex which is specifically associated with photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, 724: 151-158.
- HERRON H. A. et D. MAUZERALL. 1972. The development of photosynthesis in a greening mutant of *Chlorella* and an analysis of the light saturation curve. *Plant Physiol.*, 50: 141-148.
- HILL, R. et F. BENDALL. 1960. Function of the two cytochrome components in chloroplasts- a working hypothesis. *Nature (London)*, 186: 136-137
- HOMANN, P. H. 1969. Cations effects on the fluorescence of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, 44: 932-936.
- HOPKINS, W. G., J. B. GERMAN et D. B. HAYDEN. 1980. A light-sensitive mutant maize (*Zea mays* L.) II. Photosynthetic properties. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 100: 15-24.
- HUNER, N. P. A. 1984. Acclimation of winter rye to cold-hardening temperatures in an increased capacity for photosynthetic electron transport. *Can. J. Bot.*, 63: 506-511.
- IZAWA, S. et N. E. GOOD. 1966. Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. II. Electron microscopy. *Plant Physiol.*, 41: 544-552.

- JENNINGS, R. C., G. FORTI, P. D. GEROLA et F. M. CARLASCHI. 1978. Studies on cation-induced thylakoid membrane stacking, fluorescence yield, and photochemical efficiency. *Plant Physiol.*, 62: 879-884.
- JENNINGS, R. C., F. M. GARLASCHI, P. D. GEROLA et G. FORTI. 1980a. Grana formation in chloroplasts may promote energy transfer between photosystem II unit. *FEBS Lett.*, 117: 332-334.
- JENNINGS, R. C., F. M. GARLASCHI, P. D. GEROLA, R. ETZION-KATZ et R. FORTI. 1980b. Proton-induced grana formation in chloroplasts: distribution of chlorophyll-protein complexes and photosystem II photochemistry. *Biochem. Biophys. Acta*, 638: 100-107.
- JENNINGS, R. C., P. D. GEROLA, F. M. GARLASCHI et G. FORTI. 1981. Effects of trypsin and cations on chloroplast membranes. *Plant. Physiol.*, 67: 212-215.
- JENNINGS, R. C. 1984. Independent effects of magnesium on energy-transfer processes in chloroplast. *Biochem. Biophys. Acta.*, 766: 303-309
- JENNINGS, R. C. et G. ZUCHELLI. 1985. The influence of membrane stacking on light absorption by chloroplasts. *Photobiochem. Photobiophys.*, 9: 215-221.
- JORDAN, B. R., W.-S. CHOW et A. J. BAKER. 1983. The role of phospholipid in the molecular organization of pea chloroplast membranes. Effect of

phospholipid depletion on photosynthetic activities. *Biochem. Biophys. Acta*, 725: 77-86.

KIRK, J. T. O. et R. A. E. TILNEY-BASSET. 1978. In: *The plastids: Their chemistry, structure, growth and inheritance*. Ed. G. AKOYUNOGLU. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. p. 64. ✓

KYLE, D. et S. ZALIK. 1982. Development of photochemical activity in relation to pigment and membrane protein accumulation in chloroplasts of barley and its virescens mutant. *Plant Physiol.*, 69: 1392-1400.

KYLE, D., I. OHAD et C. J. ARNTZEN. 1984. Membrane protein damage and repair. Selective loss a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. USA*, 81: 4070-4074.

KYLE, D. J. 1985. The 32000 Dalton Q_B protein of photosystem 2. *Photochem. Photobiol.*, 41: 107-116.

KUANG, T. Y., P. Y. ZUO, C. T. CHUANG, S. J. LON, T. S. LI, H. P. HAO et S. C. LIN. 1980. Structure and function of chloroplast membranes. *Photobiochem. Photobiophys.*, 1: 73-82.

LAM, E., W. ORTIZ, S. MAYFIELD et R. MALKIN. 1984a. Isolation and characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b protein complex associated with photosystem I. *Plant Physiol.*, 74: 650-655.

- LAM, E., W. ORTIZ, et R. MALKIN. 1984b. Chlorophyll a/b proteins of photosystem I. FEBS Lett., 168: 10-14
- LAROCHE, A. 1983. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor* L. Méthode de purification des chloroplastes et caractérisation des constituants protéiques et lipidiques des membranes granaires et thylakoïdiennes. Mémoire de maîtrise, Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, 113 p.
- LASKAY, G. et E. LEHOCZKI. 1986. Correlation between linolenic-acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley. Biochem. Biophys. Acta, 849: 77-84.
- LATIMER, P. 1959. Influence of selective light scattering on measurements of absorption spectra of *Chlorella* Plant Physiol., 34: 193-199.
- LAROVEL, J. et P. JOLIOT. 1972. A connected model of the photosynthetic unit. Biophys. J., 12: 815-831.
- LEE, J.C. et S. N. TIMASCHEFF. 1981. The stabilization of proteins by sucrose. J. Biol. Chem., 256: 7193-7201.
- LEMOINE, Y. J.-P. DUBACQ et G. ZABULON. 1986. Organization of the photosynthetic apparatus from triazine-resistant and-susceptible biotypes of several plant species. Can. J. Bot., 64: 2999-3007.

- LEONG, T.-Y. et J. M. ANDERSON. 1984. Effect of light quality on the composition and function of thylakoid membranes in *Atriplex triangularis*. Biochem. Biophys. Acta, 766: 533-541.
- LEONG, T.-Y., D. J. GOODCHILD et J. M. ANDERSON. 1985. Effect of light quality on the composition, function, and structure of photosynthetic thylakoid membranes of *Asplenium australasicum* (Sm.) Hook. Plant Physiol., 78: 561-567.
- LETO, K. et C. ARNTZEN. 1981. Cation-mediated regulation of excitation energy distribution in chloroplasts lacking organized photosystem II complexes. Biochem. Biophys. Acta. 637: 107-117.
- LICHTENTHALER, H. K. et C. BUSCHMANN. 1978. Control of chloroplast development by red light, blue light and phytochromes. In: Chloroplast development. Ed. G. AKOYUNOGLU et J. H. ARGYROUDI-AKOYUNOGLU. Elsevier/North-Holland Biomedical press. N.-Y. p. 801-816.
- LICHTENTHALER, H. K., G. KUHN, U. PRENZEL et D. MEIER. 1982. Chlorophyll-protein levels and degree of thylakoid stacking in radish chloroplasts from high-light, low-light and bentazon-treated plants. Physiol. Plant., 56: 183-188.
- LIEBERMAN, J. R., S. BOSE et C. J. ARNTZEN. 1978. Requirement of the light-

harvesting pigment-protein complex for magnesium ion regulation of excitation energy distribution in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 502: 417-429.

LYNCH, D. V. et G. A. Jr. THOMPSON. 1984. Retailored lipid molecular species : a tactical mechanism for modulating membrane properties. *Trends Biochem. Sci.*, : 412-445.

MALKIN, S. et B. KOK. 1966. Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts I. Number of components involved in the reaction and quantum yields. *Biochem. Biophys. Acta*, 126: 413-432.

MALKIN, S. 1981. Control of photosynthetic electron transport from reaction center to electron carriers of photosystem II studied by fluorescence induction. *Israel J. Chem.*, 21: 306-315.

MALKIN, S., P. A. ARMOND, H. A. MOONEY et D. C. FORK. 1981. Photosynthetic unit size from fluorescence induction in leaves. *Plant. Physiol.*, 67: 570-579.

MANNAN, R. M. et S. BOSE. 1985. Basf 13.338 induced changes in structure and function of the photosynthetic apparatus of wheat seedlings. *Photochem. Photobiol.*, 41: 63-72.

MARDER, J. B., A. K. MATTOO, P. GOLOUBINOFF et M. EDELMAN. 1984. Structure and physiological control of the rapidly metabolized 32,000-dalton

chloroplast membrane protein. In: Biosynthesis of the photosynthetic apparatus molecular biology development and regulation. Ed. J. P. THORNER, L. A. STAEHELIN et R. B. HALLICK. Alan R. Liss Inc. p. 309-311.

MATTOO, A. K., H. HOFFMAN-FALK, J. B. MARDER et M. ELDELMAN. 1984a. Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1380-1384.

MATTOO, A. K., J. B. ST. JOHN et W. P. WERGIN. 1984b. Adaptative reorganization of protein and lipid components in chloroplast membranes as associated with herbicide binding. In: Biosynthesis of the photosynthetic apparatus molecular biology development and regulation. Ed. J. P. THORNER, L. A. STAEHELIN et R. B. HALLICK. A. R. Liss Inc. p. 163-174.

MAUZERALL, D. et H. A. HERON. 1970. The light saturation curve of photosynthesis. Biochem. Biophys. Acta, 205: 312-314.

MCCOURT P., J. BROWSE, J. WATSON, C. J. ARNTZEN et C. R. SOMERVILLE. 1985. Analysis of photosynthetic antenna function in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) lacking trans-hexadecenoic acid. Plant Physiol., 78: 853-858.

- MELIS, A. 1984. Light regulation of photosynthetic membrane structure, organization, and function. *J. Cell Biochem.*, 24: 271-285.
- MILLS, J. D. 1976. The role of metal cations in the control of *in vivo* chlorophyll a fluorescence. Thèse de doctorat. Université de Londres et de l'Imperial College, Londres. 290 p.
- MORELAND, D. E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 597-638.
- MULLET, J. E. et C. ARNTZEN. 1980. Simulation of grana stacking in a model membrane system mediated by a purified light-harvesting pigment-protein complex from chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 589: 100-117.
- MULLET, J. C. VERNOTTE et J.-M. BRIANTAIS. 1981. The relationships between thylakoid structure and excitation transfer in isolated chloroplasts using gramicidin j. *Photobiochem. Photobiophys.*, 2: 1-10.
- MURAKAMI, S. et L. PACKER. 1971. The role of cation in the organization of chloroplast membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, 146: 337-347.
- MURATA, N. 1969. Control of excitation transfer in photosystem II. Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 171-181.

- MURATA, N., H. TASHIRO et A. TAKAMIYA. 1970. Effects of divalent metal ions on chlorophyll a fluorescence in isolated spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 197: 250-256.
- MURPHY, D. J. 1982. The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids. *FEBS Lett.*, 153: 47-51.
- NAKATANI, H. Y., J. BARBER et J. A. FORRESTER. 1978. Surface charges on chloroplast membranes as studied by particle electrophoresis. *Biochem. Biophys. Acta*, 504: 215-225.
- NAKATANI, H. Y., J. BARBER et M. J. MINSKI. 1979. The influence of the thylakoid membrane surface properties on the distribution of ions in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 545: 24-35.
- NISHIO, J. N., S. E. TAYLOR et N. TERRY. 1985. Changes in thylakoid galactolipids and protein during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiol.*, 77: 705-711.
- ORT, D. R. et S. IZAWA. 1974. Studies on the energy-coupling sites of photophosphorylation. *Plant Physiol.*, 77: 705-711.
- PANIGRAHI, P. K. et U. C. BISWAI. A. 1979a. Ageing of chloroplasts *in vitro* I. Quantitative analysis of the degradation of pigment proteins and nucleic acids. *Plant Cell Physiol.*, 775-779.

- PANIGRAHI, P. K. et U. C. BISWAI. 1979b. Ageing of chloroplasts *in vitro* II. Changes in absorption spectra and the DCPIP Hill reaction. *Plant Cell Physiol.*, 20: 781-787.
- PAPAGEORGIOU, G. C. 1975. Chlorophyll fluorescence: A intrinsic probe of photosynthesis. In: *Bioenergetics of photosynthesis*. Ed. GOVINDJEE. Academic press. N. Y. 319-371.
- PAPAGEORGIOU, G. C. 1980. Stabilization of chloroplasts and subchloroplast particles. *Methods in enzymology*, 69: 613-625.
- PFISTER, K. et C. J. ARNTZEN. 1979. The mode action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotype. *Z. Naturforsch.* 34c: 996-1009.
- PFISTER, K., K. E. STEINBACK et C. J. ARNTZEN. 1981. Characterization of the thylakoid membrane protein which binds photosystem II inhibitors. In: *Photosynthesis VI. photosynthesis and productivity, photosynthesis and environment*. Ed. G. AKOYUNOGLU. p. 595-606.
- PROCHASKA, L. J. et E. L. GROSS. 1977. Evidence for the location of divalent cation binding sites on the chloroplast membrane. *J. Membr. Biol.* 36: 13-32.
- QUIN, P. J. et W. P. WILLIAMS. 1983. The structural role of lipids in photosynthetic membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 737: 223-266.

RABINOWITCH, E. 1958. La photosynthèse. GAUTHIER-VILLARS. Paris. 173 p.

RABINOWITCH, E. et GOVINDJEE. 1969. Photosynthesis. John Wiley & sons. N. Y. 274 p.

RAMANUJA, P. et S. BOSE. 1983. Correlation between thylakoid stacking and cation-induced decrease in photosystem I electron transport at saturating light intensity. Arch. Biochem. Biophys., 221: 238-242.

RICHARD, E. P. Jr., J. R. GOSS, C. J. ARNTZEN et F. W. SLIFE. 1983. Determination of herbicide inhibition of photosynthetic electron transport by fluorescence. Weed Sci., 31: 361-367.

RYRIE, I. J., M. ANDERSON et D. J. GOODCHILD. 1980. The role of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in chloroplast membrane stacking. Eur. J. Biochem. Biophys., 107: 345-354.

RYRIE, I. J. et N. FUAD. 1982. Membrane adhesion in reconstituted proteoliposomes containing the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex: the role of charged surface groups. Arch. Biochem. Biophys., 214: 474-488.

SCOUFFLAIRE, C., R. LANNOYE et J. BARBER. 1982. Chlorophyll fluorescence and thylakoid stacking changes: electrostatic screening versus charge neutralization. Photobiochem. Photobiophys., 4: 249-256.

- SEARLE, G. F. W., J. BARBER et J. D. MILLS. 1977. 9-amino-acridine as a probe of the electrical double layer associated with the chloroplast thylakoid membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 461: 413-425.
- SIEGEL, C. O., A. E. JORDAN et K. R. MILLER. 1981. Addition of lipid to the photosynthetic membrane: Effects on membrane structure and energy transfer. *J. Cell. Biol.*, 91: 113-125.
- SIEGENTHALER, P. A. 1972. Ageing of the photosynthetic apparatus. IV. Similarity between the effects of ageing and unsaturated fatty acids on isolated spinach chloroplasts as expressed by volume changes. *Biochem. Biophys. Acta*, 275: 182-191.
- SIEGENTHALER, P. A. et A. RAWYLER. 1977. Ageing of the photosynthetic apparatus. V. Change in pH dependence of electron transport and relationships to endogenous free fatty acids. *Plant Sci. Lett.*, 9: 265-273.
- SIMARD, S., G. GRENIER, G. BEAUMONT. 1985. Influence de l'atrazine à dose sub létale sur les membranes photosynthétiques des chloroplastes de *Lemna minor*. *ACFAS*. 52-53 Ed.: 26.
- SOKAL, R. R. et F. J. ROHF. 1969. *Biometry*. Ed. W. H. Freeman, N. Y. 859 p.
- STEINBACK, K. E., J. J. BURKE et C. J. ARNTZEN. 1979. Evidence for the role of surface-exposed segments of the light-harvesting complex in

cation-mediated control of chloroplast structure and fonction. Arch. Biochem. Biophys., 195: 546-557.

STEINBACK, K. E., L. McINTOSH, L. BOGORAD et C. J. ARNTZEN. 1981. Identification of the triazine receptor protein as chloroplast gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7463-7467.

SUN, A. S. H. et K. SAUER. 1971. Pigment systems and electron transport in chloroplasts. I. Quantum requirements for the two light reactions in spinach chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta, 234: 399-414.

SZITO, T., G. I. GARAB, L. A. MUSTARDY, J. G. KISS et A. FALUDI-DANIEL. 1984. Increasing fluctuation in orientation of pigment-protein complexes within photosynthetic membranes treated with linolenic acid. Photochem. Photobiophysics., 8: 239-249.

THORNER, J.P. 1975. Chlorophyll-protein: light-harvesting and reaction center components of plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 26: 127-158.

TIKHONOV, A. N., G. B. KHOMUTOV et E. K. RUUGE. 1984. Electron transport control in chloroplasts. Effects of magnesium ion on the electron flow between photosystems. Photobiochem. Photobiophys., 8: 261-269.

TREMOLIERES, A., J.-P. DUBACQ, F. AMBARD-BRETTEVILLE et R. REMY. 1981. Lipid composition of chlorophyll-protein complexes. Specific enrichment in

trans-hexadecenoic acid of oligomeric form of lightharvesting chlorophyll a/b-protein. FEBS Lett., 130: 27-31.

VAN RENSEN, J. J. S. 1982. Molecular mechanisms of herbicide action near photosystem II. Physiol. Plant., 54: 515-521.

VAUGHN, K. C. et S. O. DUKE. 1984. Ultrastructural alterations to chloroplasts in triazine-resistant weed biotypes. Physiol. Plant., 62: 510-520.

VENEDIKTOV, P. et A. A. KRIVOSHEJEVA. 1983. The mechanisms of fatty-acid inhibition of electron transport in chloroplasts. Planta, 159: 411-414.

VERNON, L. P. et E. R. SHAW. 1969. Photosystem II activities in subchloroplast fragments obtained by detergent. Biochem. Biophys. Res. Commun., 36: 878-884.

WINTERMANS, J. F. G. M., P. J. HEIMSING, B. J. J. POLMAN, J. Van GINSBERGEN et J. COLLARD. 1969. Galactolipid transformations and photochemical activities of spinach chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta, 189: 95-105.

WOLLMAN, F.-A., J. OLIVE, P. BENOUM et M. RECOUVREUR. 1980. Organization of the photosystem II centers and their associated antennae in the thylakoid membranes: a comparative ultrastructural, biochemical and biophysical study of *Chlamydomonas* wild type and mutants lacking in photosystem II reaction centers. J. Cell Biol., 87: 728-735.

- WOLLMAN, F.-A. et B. A. DINER. 1980. Cation control of fluorescence emission, light scatter and membrane stacking in pigment mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Arch. Biochem. Biophys., 201: 646-659.
- WONG, D., H. MERKELO et GOVINDJEE. 1981. Estimation of energy distribution and redistribution among two photosystems using parallel measurements of fluorescence lifetimes and transients at 77 K. Photochem. Photobiol., 33: 97-101.